

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Pathologie und Neuropathologie,
Abteilung für Neuropathologie

**Alzheimer-Pathologie und Reelin-Signalweg:
Die genotyp-, alters- und areal-abhängige Expression von Dab1 und ApoER2
in einem transgenen Mausmodell**

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Katharina Marie Steiner
aus Seeheim-Jugenheim
2013

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Jan Buer
1. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. med. Kathy Keyvani
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. D. Herman

Tag der mündlichen Prüfung: 19. November 2013

Diese Arbeit ist zum Teil in der folgenden Veröffentlichung enthalten:

Herring, A.*, Donath, A.*, **Steiner, K. M.**, Widera, M. P., Hamzehian, S., Kanakis, D., Koelble, K., Elali, A., Hermann, D. M., Paulus, W., Keyvani, K. (2012): Reelin depletion is an early phenomenon of Alzheimer pathology. J. Alzheimers Dis. 29, 1-17.

*equally contributing authors

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
1. Einleitung.....	6
1.1. Die Alzheimer-Krankheit	6
1.1.1. Historisches	6
1.1.2. Epidemiologie.....	7
1.1.3. Definition, Klinik und Verlauf	7
1.1.4. Diagnostik und Therapie	8
1.1.5. Ätiologie, Neuropathologie und Pathophysiologie	9
1.2. Die Reelin-Signalkaskade.....	14
1.2.1. Bedeutung der Reelin-Signalkaskade in der ZNS-Entwicklung	16
1.2.2. Bedeutung der Reelin-Signalkaskade im adulten Gehirn.....	16
1.2.3. Auswirkung von Alterungsprozessen auf die Reelin-Signalkaskade	17
1.3. Die Reelin-Signalkaskade im Kontext der Alzheimer-Krankheit	19
1.4. Vorarbeiten und Fragestellung der Doktorarbeit.....	22
2. Material und Methoden	23
2.1. Tiere und Studiendesign	23
2.2. Fixierung von Gehirnen.....	25
2.3. Extraktion mit TRIzol® <i>reagent</i>	26
2.3.1. DNA-Isolation	26
2.3.2. Proteinextraktion	27
2.4. Immunblot (Western Blot).....	28
2.4.1. Probenvorbereitung	28
2.4.2. Gelelektrophorese.....	29
2.4.3. Proteintransfer	30
2.4.4. Proteindetektion durch spezifische Antikörper	31
2.5. Statistik	34
3. Ergebnisse.....	35
3.1. Analyse der Dab1-Expression	36
3.1.1. Altersabhängige Abnahme der Dab1-Expression bei transgenen und Wildtyp- Mäusen im Hippokampus.....	36
3.1.2. Altersabhängige Abnahme der Dab1-Expression bei transgenen Mäusen im Entorhinalkortex	37
3.1.3. Dab1-Expression im Frontalkortex: Genotyp- und altersunabhängig.....	38

3.2. Analyse der ApoER2-Expression	39
3.2.1. Altersabhängige Reduktion der ApoER2-Expression bei transgenen und Wildtyp-Mäusen im Hippokampus	39
3.2.2. Kein Einfluss von Genotyp oder Alter auf die ApoER2-Expression im Frontal- und Entorhinalkortex	40
3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	42
4. Diskussion	43
4.1. Dab1-Expression	45
4.2. ApoER2-Expression	47
4.3. Methodenkritik: Maus versus Mensch	48
4.4. Schlussfolgerungen/Ausblick	49
5. Zusammenfassung	54
Literaturverzeichnis	55
Anhang.....	65
Abkürzungsverzeichnis	65
Abbildungsverzeichnis	67
Tabellenverzeichnis	68
Geräteverzeichnis	69
Danksagung	70
Lebenslauf	71

1. Einleitung

1.1. Die Alzheimer-Krankheit

1.1.1. Historisches

„Um offen zu sein,
ich fürchte, ich bin nicht bei vollem Verstand. Mir scheint,
ich sollte Euch kennen, und diesen Mann auch, doch ich
bin im Zweifel; denn ich bin völlig im unklaren, was
für ein Ort dies ist, und alle Kenntnis, die ich habe, erinnert
sich nicht an diese Kleider; auch weiß ich nicht, wo
ich letzte Nacht gewohnt habe.“

(Shakespeare, 1607/1608, König Lear, Akt IV, Szene 7)

Offensichtlich litt König Lear an Demenz, vermutlich an der Alzheimer-Krankheit. Somit beschrieb Shakespeare bereits um das Jahr 1605 ein Krankheitsbild, das erst gute 300 Jahre später Eingang in die medizinische Dokumentation fand, als Alois Alzheimer, ein bayrischer Psychiater und Neuropathologe am dritten November 1906 auf der 37. Versammlung Südwestdeutscher Irrenärzte in München einen Vortrag über das „eigenartige Krankheitsbild“ seiner Patientin Auguste D. hielt. Sie litt laut Alzheimer unter einer Demenzform mit Beginn um das 50. Lebensjahr und zeigte klinisch eine fortschreitende Gedächtnisschwäche und Störungen anderer kognitiver Funktionen, eine eingeschränkte Sprachfunktion, Wahnvorstellungen und ein sozial inadäquates Verhalten (Alzheimer, 1907). Zudem beschrieb er eigenartige Knäule innerhalb von Nervenzellen und extrazelluläre kortikale Plaques – die beiden Charakteristika der Alzheimer-Krankheit, auf denen bis heute die neuropathologische Diagnose basiert. Alzheimers Beschreibung des Krankheitsbildes deckt sich in weiten Teilen mit der heutigen Definition der Alzheimer-Krankheit, jedoch vergingen weitere 50 Jahre, bis sich die Erkrankung, die Alzheimer bei einer 50-Jährigen diagnostizierte, als ununterscheidbar von der häufigsten Form der senilen Demenz mit Auftreten ab dem 65. Lebensjahr herausstellte (Blessed et al., 1968).

1.1.2. Epidemiologie

Heute leiden in Deutschland ca. 1,2 Millionen Menschen an Demenz (Bickel, 2010), wobei die Alzheimerkrankheit mit einem Anteil von ca. zwei Dritteln die häufigste Demenzform darstellt (Bickel, 2001). Weltweit sind über 35 Millionen Menschen betroffen; alle sieben Sekunden tritt ein neuer Demenzfall auf (Prince et Jackson, 2009).

Die altersspezifische Prävalenz der Alzheimer-Krankheit nimmt mit steigendem Lebensalter drastisch zu, ab einem Lebensalter von 65 Jahren beobachtet man eine Verdopplung der Prävalenzrate nach jeweils fünf weiteren Altersjahren: Während unter den 65- bis 69-Jährigen in Deutschland 0,7-1,0 % an der Alzheimer-Krankheit leiden, findet man unter den 95-Jährigen und älteren 39,8 bis 48,9 % Erkrankte (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2005).

Die Inzidenzrate der Alzheimer-Krankheit beträgt unter den 65-Jährigen und Älteren in Europa 19,4 pro 1000 Personenjahre und nimmt ab einem Lebensalter von 65 Jahren sogar exponentiell zu (Qiu et al., 2009).

Angesichts der alternden Weltbevölkerung – Schätzungen zufolge wird die Anzahl der über 65-Jährigen von 420 Millionen im Jahr 2000 auf fast eine Milliarde im Jahr 2030 zunehmen – wird die Anzahl der an Alzheimer Erkrankten zukünftig immens ansteigen (Vereinte Nationen, 2001). In Deutschland rechnet man bis zum Jahr 2050 mit einer Verdopplung der Demenzfälle (Bickel, 2001). Die derzeitige Situation wie die zu erwartende Entwicklung konfrontiert das Gesundheitssystem mit massiven Anforderungen: In Industrieländern lebt fast die Hälfte aller Demenzkranken in Institutionen, umgekehrt leiden ca. drei Viertel aller Pflegeheimbewohner unter Demenz. Schätzungen zufolge belaufen sich die weltweiten Demenzkosten bereits heute auf 315 Milliarden US\$ pro Jahr (Prince et Jackson, 2009).

1.1.3. Definition, Klinik und Verlauf

Gemäß der ICD-10 versteht man heute unter Demenz eine Störung des Gedächtnisses und die Beeinträchtigung zumindest einer weiteren kognitiven Funktion, welche mindestens sechs Monate besteht und zu einer alltagsrelevanten Einschränkung der Lebensführung führt.

Die Alzheimer-Krankheit, die häufigste Ursache einer Demenz, beginnt meist schleichend mit geringen Merkfähigkeitsstörungen und leichten Verhaltensänderungen, dergestalt, dass Betroffene weniger aktiv erscheinen und sich sozial zurückziehen, was zunächst meist nur den Angehörigen auffällt. Die angesprochene Merkfähigkeitsstörung oder anterograde Amnesie ist sicherlich das charakteristischste Symptom der Alzheimer-Krankheit und nimmt ab der Frühphase der Erkrankung immer weiter zu. Im Verlauf kann es bei völliger Bewusstseinsklarheit zur Beeinträchtigung der zeitlich-räumlichen Orientierung, der Kommunikationsfähigkeit, der Auffassung und des Urteilsvermögens kommen (Burns et Iliffe, 2009). Im fortgeschrittenen Stadium leidet ein Drittel der Betroffenen unter einem Parkinson-Syndrom, ein Fünftel bis ein Zehntel zeigt Myoklonien, eventuell kann Harn- oder Stuhlinkontinenz auftreten. Störungen des Erlebens und Verhaltens wie Depressionen, Unruhe, Apathie, Wahnsymptome und Halluzinationen sowie ausgeprägte Schlafstörungen finden sich im Verlauf bei 70% der Erkrankten (S3-Leitlinie „Demenzen“, DGPPN et DGN, 2009). Im Spätstadium befinden sich die Patienten in einem Zustand vollkommener Hilflosigkeit und Abhängigkeit, was von Betroffenen wie von Angehörigen als äußerst belastend erlebt wird. Der Krankheitsverlauf erstreckt sich über ca. 8 Jahre: Gewöhnlich beobachtet man nur geringe Veränderungen während der ersten zwei Krankheitsjahre, es folgt eine Phase rascher Progression bei wiederum langsamerem Fortschreiten in der Spätphase (S3-Leitlinie „Demenzen“, DGPPN et DGN, 2009). Allerdings bleibt festzuhalten, dass sowohl der Krankheitsverlauf als auch die Symptome und Symptomausprägungen von Patient zu Patient sehr stark variieren (Burns et Iliffe, 2009).

1.1.4. Diagnostik und Therapie

Die Diagnostik der Alzheimer-Krankheit beruht maßgeblich auf Anamnese und neurologisch-psychiatrischer Untersuchung einschließlich neuropsychologischer Tests. Es gilt sekundäre Ursachen einer Demenz anamnestisch, durch Laboruntersuchung und CT oder ggf. MRT auszuschließen. Ergeben sich Hinweise auf eine entzündliche ZNS-Erkrankung sollte zusätzlich eine Liquordiagnostik erfolgen. Die liquorbasierte neurochemische Demenzdiagnostik, bei der β -Amyloid, Gesamt- τ und Phospho- τ im Liquor bestimmt werden, kann der Differenzierung zwischen primären und sekundären demenziellen Syndromen nützlich sein (S3-Leitlinie „Demenzen“, DGPPN et DGN, 2009).

Die Acetylcholinesterasehemmer Donezepil, Rivastigmin und Galantamin sind zur symptomatischen Behandlung der leichten und mittelschweren Demenz zugelassen. Gemäß der cholinergen Hypothese der Alzheimer-Krankheit, wonach es durch Untergang cholinergischer Neurone im basalen Vorderhirn zu kognitiven Störungen kommt, soll somit eine Verstärkung der cholinergen Neurotransmission erzielt werden. Memantine soll als nicht-kompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist Neurone vor Glutamat-vermittelter Exzitotoxizität bewahren und ist für die symptomatische Behandlung der mittelschweren und schweren Alzheimer-Krankheit zugelassen. In Bezug auf die Verbesserung der kognitiven Funktion und Alltagsfunktionen zeigen beide Medikamentengruppen signifikante, indes mäßige klinische Erfolge.

Trotz beachtlicher wissenschaftlicher Fortschritte hinsichtlich des pathogenetischen Geschehens der Alzheimer-Krankheit in den letzten Jahren existiert bislang keine kausale Behandlungsmöglichkeit (Blennow et al., 2006).

1.1.5. Ätiologie, Neuropathologie und Pathophysiologie

Die Ätiologie der Alzheimer-Krankheit ist bislang unbekannt, ausgenommen seltener familiärer Formen, die sich auf ca. 5 % der Alzheimer-Fälle belaufen und autosomal dominant vererbt werden.

Genetisch liegen der familiären Form der Alzheimer-Krankheit (FAD; familial Alzheimer's disease) Mutationen im APP-Gen (Chromosom 21), im Präsenilin-1- (Chromosom 14) und -2-Gen (Chromosom 1) zugrunde. Mutationen in diesen drei Genen führen zu einer vermehrten APP-Prozessierung (siehe unten). Die FAD ist klinisch wie neuropathologisch ununterscheidbar von der sporadischen Form der Alzheimer-Krankheit, allerdings tritt sie in der Regel weit vor dem 65. Lebensjahr, also wesentlich früher auf (Selkoe, 2001).

Prädisponierend für die sporadische Form der Alzheimer-Krankheit ist nach dem heutigen Stand der Kenntnis das $\epsilon 4$ -Allel des Apolipoproteins E (ApoE) (Strittmacher et al., 1993), das unter Erkrankten deutlich überrepräsentiert ist, ohne jedoch hinreichende oder notwendige Bedingung für das Auftreten der Krankheit zu sein.

Die neuropathologische Diagnose Alzheimer-Krankheit erfordert das Vorhandensein von neuritischen Plaques und neurofibrillären Bündeln (NFT, neurofibrillary tangles).

Neuritische, oder senile Plaques sind Ablagerungen extrazellulären Amyloids, verbunden mit axonaler sowie dendritischer Schädigung und sind vorwiegend im limbischen System und im Assoziationskortex lokalisiert. Diese Läsionen entwickeln sich langsam über Monate und Jahre und erreichen Durchmesser von 10 bis 120 μm .

Sie bestehen aus filamentärem A β -Peptid (Masters et al., 1985), namentlich aus den Peptiden A β 40 und A β 42, das heißt A β -Formen, die auf die Aminosäuren 40 bzw. 42 enden. A β -Peptide weisen einen hohen Gehalt an β -Faltblattstrukturen auf, woraus auch die typischen Färbungseigenschaften des Amyloids resultieren. Dystrophische Neuriten wie auch aktivierte Mikroglia finden sich sowohl im Inneren als auch in der direkten Umgebung des Amyloidkerns, während Astrozyten das Äussere der Amyloidplaques umringen.

A β -Peptide entstehen durch proteolytische Spaltung des amyloiden Vorläuferproteins (APP, amyloid precursor protein), das zu einer heterogenen Gruppe ubiquitär exprimierter Typ I-Transmembranproteine gehört. Im Gehirn scheint APP als neuroprotektiver und/oder neurotrophischer Faktor zu wirken (Mattson et al., 1993) und ist für die Migration neuronaler Vorläuferzellen von Bedeutung (Young-Pearse et al., 2007). Des weiteren geht man von einer Bedeutung des APP für lokomotorische Funktionen und Neuritenwachstum aus (Perez et al., 1997, Zheng et al., 1995). APP kann durch α -, β -, oder γ -Sekretasekomplexe gespalten werden. A β -Oligomere entstehen, indem das nach β -Sekretasespaltung in der Membran verbleibende C-terminale Fragment des APP nachfolgend von der γ -Sekretase geschnitten wird. Dieser Prozess beschreibt die sogenannte amyloidogene APP-Prozessierung.

Die Entstehung von A β -Peptiden stellt per se kein pathologisches Ereignis dar (Seubert et al., 1992), vielmehr geht man davon aus, dass ein Ungleichgewicht zwischen A β -Bildung und -Clearance ursächlich für den Anstoß einer pathogenetischen Kaskade ist, an deren Ende neuronale Dysfunktion und Demenz stehen. Die Ablagerung von A β -Oligomeren führt demnach zu Mikro- und Astrogliaaktivierung wie Entzündungsreaktionen, die ihrerseits eine Veränderung der neuronalen Ionenhomöostase und oxidativen Stress bewirken, was schließlich zu gestörter neuronaler Funktion bzw. Transmitterdefiziten führt (Hardy et al., 2002).

Von neuritischen Plaques abzugrenzen sind diffuse oder präamyloide Plaques, die sich auch in für die Alzheimer-Krankheit untypischen Gehirnarealen und bei alten Menschen ohne Alzheimer-Krankheit finden. Offenbar handelt es sich hierbei um Vorläuferläsionen der neuritischen Plaques (Lemere et al., 1996).

Bei ca. 80 % der Alzheimer-Fälle findet man neben Amyloid-Plaques im Parenchym auch A β -Ablagerungen in Gefäßwänden zerebraler Blutgefäße. Hierbei handelt es sich um die zerebrale Amyloidangiopathie (CAA, cerebral amyloid angiopathy). Amyloidfibrillen finden sich typischerweise in der äußeren Basalmembran der Gefäße und können sich darüber hinaus bis ins Parenchym ausbreiten (Verbeek et al., 2000). Die CAA betrifft vornehmlich kleine Arterien der Leptomeningen und penetrierende Arterien des zerebralen und zerebellären Kortex. Die CAA-bedingte Störung der Integrität der Gefäßwand und die resultierende Fehlfunktion der Blut-Hirn-Schranke bilden eine weitere Komponente im pathogenetischen Netzwerk der Alzheimer-Krankheit.

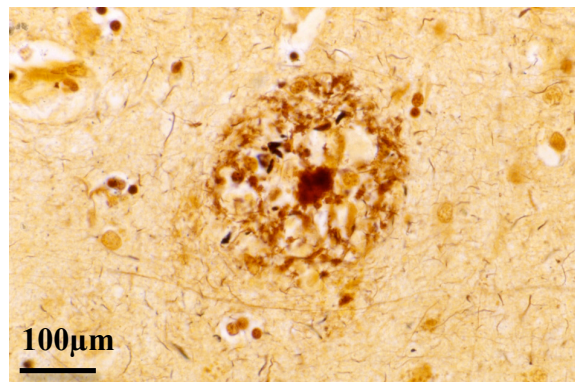


Abbildung 1: Seniler Plaque (Silberfärbung, 100x Vergrößerung, 1cm \triangleq 100µm)
(Marcus et Jacobson, 2003).

Bei NFT, dem anderen neuropathologischen Hauptmerkmal der Alzheimer-Krankheit, handelt es sich um intraneuronale Bündel 22 nm dicker, Helix-bildender Filamente. NFT finden sich zunächst im Entorhinalkortex, schließlich im Hippokampus und der Amygdala und später in neokortikalen Assoziationsfeldern sowie in bestimmten subkortikalen Kernen, die in diese Regionen projizieren. Sie bestehen aus hyperphosphorylierten τ -Protein (Grundke-Iqbal et al., 1986). τ ist assoziiert mit Mikrotubuli und dient deren Polymerisa-

tion und Stabilität. Im hyperphosphorylierten Zustand kann τ diese Funktion nicht länger erfüllen, was zum Zerfall von Mikrotubuli und demzufolge zu einer Störung des axonalen Transports, im Weiteren zu einer Beeinträchtigung neuronaler bzw. synaptischer Funktionen führt (Merrick et al., 1997).

τ kann von verschiedenen Proteinkinasen phosphoryliert werden: Unter anderem von der Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β), der Cyclin-abhängigen Kinase 5 (Cdk5), der Proteinkinase A (PKA), einer MAP-Kinase (MAPK) und der MARK (Goedert, 1996, Illenberger et al., 1997).

Hingegen bleibt fraglich, welche Kinase die Hyperphosphorylierung von τ initiiert und somit die beschriebene pathologische Kaskade in Gang setzt. Von Bedeutung könnte die konstitutive Aktivierung der Cdk5 sein, indem deren regulatorische Untereinheit p35 proteolytisch gespalten wird, wobei das Fragment p25 entsteht. Es konnte gezeigt werden, dass p25 in Neuronen bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit akkumuliert (Patrick et al., 1999). Hypoxie, Calcium-Einstrom sowie die Zugabe von A β -Oligomeren können die Umwandlung von p35 zu p25 bewirken (Lee et al., 2000), wodurch eine Verknüpfung zwischen der A β - und der τ -Pathologie hergestellt wäre.

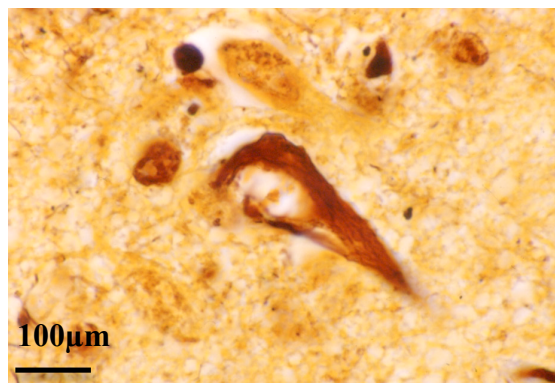


Abbildung 2: Neurofibrillärer Tangle (Silberfärbung, 100x Vergrößerung, 1cm \triangleq 100 μ m) (Marcus et Jacobson, 2003).

Ob es sich bei der Hyperphosphorylierung des τ -Proteins und der resultierenden Entstehung von NFTs um ein ursächliches Geschehen oder die Folge der Alzheimer-Krankheit handelt, bleibt bislang unklar.

Man nimmt an, dass die A β - vor der τ -Pathologie auftritt (Jack et al., 2010), allerdings ohne zu wissen, welche Wechselwirkungen es gibt, welche Faktoren im Spannungsfeld von zerebrovaskulärer Pathologie, Entzündungsreaktionen, Zellzyklusdysregulation und mitochondrialer Dysfunktion konsekutiv oder konzessiv, qualitativ oder quantitativ wirken (Blennow et al., 2006).

1.2. Die Reelin-Signalkaskade

Reelin ist ein hochkonserviertes 450 kDa großes extrazelluläres Glykoprotein, dessen Gen erstmals 1995 isoliert wurde (D'Arcangelo et al., 1995, Hirotune et al., 1995). Während der Entwicklung des Gehirns wird Reelin von Cajal-Retzius-Zellen gebildet (Tissir et Goffinet, 2003), im erwachsenen Gehirn exprimieren GABAerge Neurone im Neokortex, im Hippokampus, im Entorhinalkortex und im Zerebellum das Protein (Pesold et al., 1998, Ramos-Moreno et al., 2006). Reelin wird an zwei Stellen unter anderem von einer Metalloprotease proteolytisch geschnitten, sodass sich fünf verschiedene Reelin-Fragmente ergeben (Lambert de Rouvroit et al., 1999).

Als Signalmolekül bindet multimeres Reelin an die Lipoproteinrezeptoren ApoER2 und VLDLR (s. Abb. 3). Beide sind als Mitglieder der LDL-Rezeptor-Familie Typ I-Transmembranrezeptoren. Während VLDLR ubiquitär vorkommt, ist die Expression von ApoER2 auf das ZNS, die Plazenta und die Testes beschränkt. Im ZNS findet sich ApoER2 im Hippokampus, im Zerebellum, in der Mitralzellschicht des Bulbus olfactorius, im Neokortex und in kortikalen Neuronen (Reddy et al., 2011).

Reelinbindung löst eine Cluster-Bildung der Rezeptoren aus (Strasser et al., 2004) und bewirkt die Phosphorylierung des zytoplasmatischen Adapterproteins disabled-1 (Dab1) durch Rekrutierung der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen Fyn und Src, die zur Familie der Src-Tyrosinkinasen (SFKs, src family tyrosin kinases) gehören (Hiesberger et al., 1999). Die Interaktion zwischen den Rezeptoren und Dab1 findet über die NPxY-Domäne von ApoER2/VLDLR statt; diese Domäne ist für die Phosphorylierung von Dab1 erforderlich (Trommsdorff et al., 1999). Ausgehend von jenem letzten Schritt verzweigt sich der Reelin-Signalweg. Unter anderem bewirkt die Phosphorylierung von Dab1 im Sinne einer endogenen Verstärkung die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, wodurch eine Kinase-Kaskade in Gang gesetzt wird, beginnend mit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), der Proteinkinase B (PKB) und mTor, die schließlich zur Hemmung der Glykogen-Kinase-3 β (GSK3 β), einer der τ -Hauptkinasen, führt. Phosphoryliertes Dab1 bedingt gleichzeitig die Rekrutierung von Ubiquitin-Ligasen und die anschließende Protein-Ubiquitylierung, was zur Endozytose des gesamten Signalkomplexes führt, sodass das Reelin-Signal beendet, Reelin ins Lysosom und Dab1 ins Proteasom transportiert wird (Knuesel, 2010).

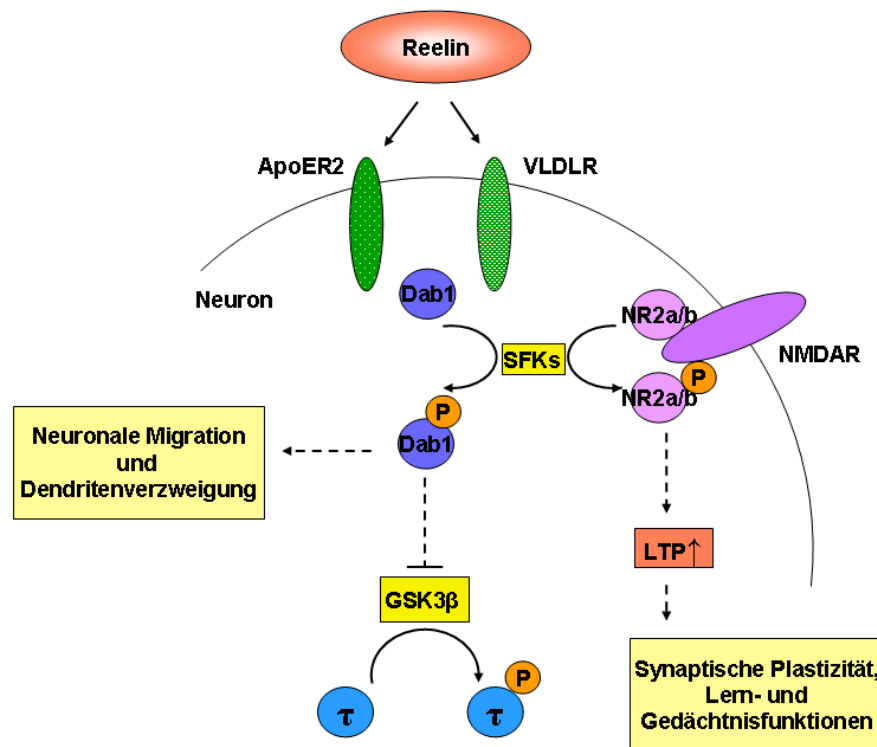


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Reelin-Signalkaskade: Reelinbindung an die Rezeptoren ApoER2 und VLDLR bewirkt die Phosphorylierung von Dab1 durch SFKs (Hiesberger et al., 1999). Phosphoryliertes Dab1 setzt eine Kinase-Kaskade in Gang (hier nicht dargestellt), welche die Hemmung der GSK3 β , einer der Hauptkinasen von τ bewirkt (Knuesel 2010). Über die Phosphorylierung der NR2a/b-Untereinheiten des NMDAR durch SFKs (s. u.) nimmt der Reelin-Signalweg Einfluss auf die LTP (Yu et al., 1997, Weeber et al., 2002, Chen et al., 2005).

1.2.1. Bedeutung der Reelin-Signalkaskade in der ZNS-Entwicklung

Betrachtet man Reelin-defiziente Mutanten, wird die Bedeutung des Reelin-Signalwegs deutlich: Sogenannte Reeler-Mäuse tragen eine natürlich vorkommende autosomal rezessiv erbliche Mutation im Reelin-Gen. Zum Reeler-Phänotyp, der lange vor der Identifizierung des zugehörigen Gens bzw. Genprodukts bekannt war, gehört eine gestörte motorische Koordination, Tremor und Ataxie (Falconer, 1951). Die Gehirne von Reeler-Mäusen zeigen eine umgekehrte Schichtung der Großhirnrinde und des Hippokampus sowie ein kleines fehlgefaltetes Zerebellum (Hamburgh, 1963). Insofern erfüllt die Reelin-Signalkaskade eine essentielle Funktion im Rahmen der neuronalen Migration wie auch der Dendritenverzweigung während der Entwicklung des ZNS (Niu et al., 2004). Dass nicht nur Reelin, sondern auch Dab1 sowie ApoER2 und VLDLR für eine korrekte neuronale Positionierung erforderlich sind, zeigt sich darin, dass Dab1-defiziente Mäuse ebenso wie ApoER2/VLDLR-Doppelmutanten einen von der Reeler-Maus ununterscheidbaren Phänotyp aufweisen (Howell et al., 1997, Trommsdorff et al., 1999).

Beim Menschen ist Reelin-Defizienz die Ursache des Norman-Roberts-Typ der Lissenzephalie, einer schweren Fehlbildung des Gehirns mit vergrößerten Hirnwindungen und weiteren Strukturabnormitäten (Hong et al., 2000).

1.2.2. Bedeutung der Reelin-Signalkaskade im adulten Gehirn

Die Funktion des Reelin-Signalwegs ist jedoch keineswegs auf die Embryonalphase beschränkt, vielmehr kann die Expression von Reelin, Dab1, ApoER2 und VLDLR lebenslanglich nachgewiesen werden (Deguchi et al., 2003).

Im Erwachsenenalter spielt die Reelin-Signalkaskade im Rahmen der Regulation synaptischer Transmission, des Neuritenwachstums und der Dendritenentwicklung eine entscheidende Rolle und ist somit für Lern- und Gedächtnisfunktionen von beträchtlicher Bedeutung:

Als neurophysiologisches Korrelat der synaptischen Plastizität, von Lern- und Gedächtnisleistungen, wird hier die Langzeitpotenzierung (LTP) betrachtet. Am zellulären Mechanismus der LTP sind AMPA- und NMDA-Rezeptoren (NMDAR) beteiligt, wobei die synaptische Stärke und aktivitätsabhängige synaptische Plastizität primär durch die Funktion

von NMDAR bedingt wird (Bliss et Collingridge, 1993). Die Aktivität des NMDAR wird unter anderem durch die Phosphorylierung seiner Untereinheiten NR2a bzw. NR2b durch SFKs reguliert (Yu et al., 1997). Es konnte nachgewiesen werden, dass durch die Reelin-Signalwirkung über die Aktivierung von SFKs (s. o.) die Untereinheiten des NMDAR phosphoryliert, die Aktivität des NMDAR somit erhöht und die LTP dadurch signifikant verstärkt wird. Für diese LTP-Verstärkung ist das Vorhandensein von Dab1, ApoER2 und VLDLR unabdingbar (Weeber et al., 2002, Chen et al., 2005). ApoER2 befindet sich in postsynaptischen Verdichtungen exzitatorischer Synapsen, in denen er mit dem NMDA-Rezeptor (NMDAR) und dem PSD-95 (postsynaptic density protein 95) einen funktionellen Komplex bildet. Für die genannte LTP-Verstärkung ist im Besonderen die Anwesenheit bestimmter Aminosäuren erforderlich, die durch das Exon 19 des ApoER2-Gens kodiert werden; Mäuse mit ausgeschaltetem Exon 19 zeigen eine gestörte Lern- und Gedächtnisfunktion. Es wurde gezeigt, dass Exon 19 des ApoER2-Gens aktivitätsabhängig alternativ gespliced wird und dadurch den Calciumeinstrom durch den NMDAR kontrolliert. Dieser Mechanismus kann somit die Reelin-vermittelte LTP-Modulation regulieren (Beffert et al., 2005). Die funktionelle Einheit zwischen ApoER2 und NMDAR wurde ferner auch durch den Nachweis extrazellulärer Interaktionen zwischen beiden Rezeptoren bestätigt (Hoe et al., 2006).

Durch die Reelinsignal-abhängige Erhöhung der NMDAR-Ströme werden darüber hinaus Genexpressionsmechanismen getriggert, die Langzeitveränderungen synaptischer Stärke zur Folge haben sowie Einfluss auf Neuritenwachstum und die Verzweigung von Dendriten nehmen (Chen et al., 2005).

Die Komponenten der Reelin-Signalkaskade erfüllen somit eine präzise regulierte physiologische Funktion im Hinblick auf die Steuerung von synaptischer Transmission, Lern- und Gedächtnisleistungen.

1.2.3. Auswirkung von Alterungsprozessen auf die Reelin-Signalkaskade

Im Zuge der physiologischen Alterung konnte sowohl bei Nagetieren als auch bei Primaten immunhistochemisch die Entstehung Reelin-positiver Ablagerungen im Hippokampus nachgewiesen werden. Gleichzeitig ließ sich eine Abnahme der hippokampalen Reelin-exprimierenden Neurone feststellen. In der Nähe kleinerer Reelin-positiver Ablagerungen fanden sich Ansammlungen ApoER2-positiver Zellen, während Dab1 vermehrt in großen

Aggregaten vorkam (Knuesel et al., 2009). Im Gegensatz dazu konnte unsere Arbeitsgruppe jene Reelin-positiven Ablagerungen jedoch nur bei gleichzeitig vorliegender Alzheimer-Pathologie nachweisen (Herring et al., 2012). Eine molekularbiologische Untersuchung des Expressionslevels dieser Komponenten der Signalkaskade im Zuge der physiologischen Alterung wurde bislang nicht vorgenommen.

1.3. Die Reelin-Signalkaskade im Kontext der Alzheimer-Krankheit

Die substanzielle Bedeutung der Reelin-Signalkaskade für synaptische Plastizität, Lern- und Gedächtnisfunktionen legt die Vermutung nahe, dass eine Störung dieses Signalwegs eine entscheidende Rolle im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen, respektive der Alzheimer-Krankheit spielen könnte, die sich klinisch durch die Beeinträchtigung eben dieser Funktionen auszeichnet. Diese Hypothese wird durch die Erkenntnis gestützt, dass die Reelin-Signalkaskade pathophysiologischen Mechanismen der Alzheimer-Krankheit entgegenwirkt: So bewirkt die Zugabe von A β -Oligomeren zu Hippokampusschnitten einen signifikanten Abfall der LTP, also eine synaptische Dysfunktion, welche durch Zugabe von Reelin wieder aufgehoben werden kann. In diesem Sinne wirken A β und Reelin am NMDAR als direkte Gegenspieler (Durakoglugil et al., 2009).

Überdies wird durch die Reelin-Signalkaskade die GSK3 β gehemmt (Ohkubo et al., 2002) und somit die Phosphorylierung von τ verhindert; gleichsam zeigen Reeler- und VLDLR/ApoER2-Doppelmutanten hyperphosphoryliertes τ -Protein (Hiesberger et al., 1999), den Bestandteil der NFTs. Defekte im Dab1-Gen scheinen zudem eine Prädisposition für τ -Hyperphosphorylierung darzustellen (Brich et al., 2003).

Vergleicht man transgene Alzheimer-Mäuse mit normaler Reelinexpression mit solchen, die zusätzlich eine Reelindefizienz aufweisen, so zeigt sich bei letzteren eine beschleunigte Entwicklung der A β -Pathologie; die verminderte Reelinexpression führt hier zu einer verstärkten amyloidogenen APP-Prozessierung, was sich in einer Zunahme an Größe und Anzahl der A β -Plaques niederschlägt (Kocherhans et al., 2010). In gleicher Weise nimmt Dab1 Einfluss auf die APP-Prozessierung: Dab1 interagiert direkt mit der zytoplasmatischen Domäne von APP, was eine verringerte β -Spaltung des APP bedingt. Umgekehrt führt der Knockout von endogenem Dab1 in primären Neuronen zu einer gesteigerten A β -Bildung (Hoe et al., 2006). Da die intrazelluläre Domäne von APP als Transkriptionsfaktor wirkt, kann Dab1 ferner über Interaktion mit derselben transkriptionale Prozesse modulieren, die für die Pathophysiologie der Alzheimer-Krankheit bedeutsam sein könnten (Müller et al., 2011). Weiterhin könnte die Interaktion zwischen Dab1 und der intrazellulären Domäne des APP auch eine Hemmung der Reelin-Signalkaskade hervorrufen, indem Dab1 auf diese Weise im Zytoplasma gehalten und dessen Bindung an die Rezeptoren VLDLR/ApoER2 somit unterbunden wird (Hoareau et al., 2008).

Auch ApoER2 kann über das extrazelluläre Matrixprotein F-Spondin mit APP interagieren und dadurch ebenfalls dessen amyloidogener Prozessierung entgegenwirken (Hoe et al., 2005).

Die Komponenten der Reelin-Signalkaskade interferieren demnach in vielerlei Hinsicht mit dem pathophysiologischen Geschehen der Alzheimer-Krankheit.

Darüber hinaus werden bei transgenen Alzheimer-Mäusen sowie Patienten mit der Alzheimer-Krankheit konkrete Veränderungen des Signalwegs und/oder einzelner Komponenten desselben beobachtet:

In von der Alzheimer-Pathologie betroffenem Gehirngewebe wurde bereits sowohl eine Steigerung als auch eine Abnahme der Reelin-Expression berichtet: Im Liquor und im Frontalkortex von Patienten und transgenen Mäusen wurde eine signifikante Erhöhung des 180 kDa Reelin-Fragments beschrieben (Botella-Lopez et al., 2006), während im Entorhinalkortex ein reduzierter Reelingehalt festgestellt wurde (Chin et al., 2007). Des Weiteren wurde im Hippokampus transgener Mäuse bereits vor dem Auftreten von A β -Plaques eine reduzierte Reelinexpression beobachtet (Herring et al., 2012).

Ferner scheinen die oben genannten Reelin-positiven Ablagerungen in transgenen Alzheimer-Mäusen mit A β -Oligomeren und nicht fibrillären A β -Plaques kolokalisiert zu sein. In diesem Kontext wird diskutiert, ob Reelin-Ablagerungen die Bildung fibrillärer A β -Plaques begünstigen könnten (Knuesel et al., 2009).

Dab1 ist im Frontalkortex von Patienten mit Alzheimer-Krankheit stark hochreguliert. Dies könnte zum einen über die Interaktion zwischen Dab1 und der intrazellulären Domäne von APP als Transkriptionsfaktor zu einer Veränderung des zellulären Genexpressionsmusters führen, zum anderen könnte der erhöhte Dab1-Gehalt mit dem physiologischen Ablauf der Reelin-Signalkaskade interferieren. Beide Auswirkungen könnten sich für die Alzheimer-Krankheit als pathogenetisch relevant erweisen (Müller et al., 2011).

ApoER2 konnte bei transgenen Alzheimer-Mäusen in Amyloidplaques umgebenden dystrophischen Neuriten und reaktiven Astrozyten nachgewiesen werden (Motoi et al., 2004). Diese enge räumliche Beziehung impliziert überdies eine funktionelle Bedeutung dieser Kaskade-Komponente in der Pathophysiologie der Alzheimer-Krankheit; nicht zuletzt dadurch, dass der ApoE ϵ 4-Polymorphismus bislang den einzigen genetischen Risikofaktor für das Auftreten der sporadischen Form der Alzheimer-Krankheit darstellt: Im Gehirngewebe von Alzheimer-Patienten konnte das ApoE-Protein in einem großen Anteil der A β -Ablagerungen nachgewiesen werden (Namba et al., 1991), Patienten mit ϵ 4-Allel zeigten

eine höhere A β -Plaque-Last (Rebeck et al., 1993) und in Abwesenheit von ApoE zeigte das A β -Peptid eine geringere Plaquebildungstendenz (Bales et al., 1997). Des Weiteren scheint ApoE ϵ 4 mit einer eingeschränkten Clearance und einem verminderten Recycling von Lipoproteinpartikeln, die Cholesterin und A β -Peptide transportieren, assoziiert zu sein, was die Akkumulation von löslichem sowie fibrillärem A β im Gehirn fördert (Urosevic et Martins, 2008). ApoE kann die Bindung von Reelin an seine Rezeptoren verhindern. Der Umstand, dass ApoE ϵ 4 wie auch ApoE ϵ 3 die Bindung von Reelin an ApoER2/VLDLR stärker unterbindet als ApoE ϵ 2 (D'Arcangelo et al., 1999) kann die Bedeutung der Reelin-Signalkaskade im Zusammenhang der Alzheimer-Pathologie noch weiter betonen.

Die Frage, ob eine Veränderung im Reelin-Signalweg Folge oder Ursache der pathogenetischen Kaskade der Alzheimer-Krankheit ist, bleibt jedoch unbeantwortet.

1.4. Vorarbeiten und Fragestellung der Doktorarbeit

Wie bereits erwähnt, konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, dass die Reelinexpression im Hippokampus schon bei 30 Tage alten transgenen Alzheimer-Mäusen verringert ist. Dies zeigt eine Störung des Reelin-Signalwegs bereits vor dem Auftreten von A β -Plaques (Herring et al., 2012). Wie jedoch verhalten sich Dab1 und ApoER2 im Zuge der Alterung sowie der Krankheitsentstehung? Welche Rolle spielt die Reelin-Kaskade im Zusammenhang der Alzheimer-Pathologie? Wirken nachgewiesene Veränderungen ursächlich oder treten sie als Konsequenz anderer Mechanismen auf? Um einer Antwort auf diese Fragen einen Schritt näher zu kommen, soll in der folgenden Arbeit der Einfluss der Alzheimer-Krankheit wie auch des Alterungsprozesses auf die Expression von Dab1 und ApoER2 in den AD-vulnerablen Arealen Hippokampus, Entorhinalkortex und Frontalkortex umfassend untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Tiere und Studiendesign

Es wurde das transgene Mausmodell TgCRND8 verwendet. TgCRND8-Mäuse weisen eine doppelte Mutation („Swedish“- Mutation K670N, M671L und „Indiana“-Mutation V717F) des humanen Amyloid-Vorläuferproteins, Splicevariante 695 (APP 695) auf. Bezüglich dieser Doppelmutation sind sie hemizygot.

Die Expression des Transgens steht unter Kontrolle des Prion-Promoters des syrischen Goldhamsters, wodurch sie sich vor allem auf Neurone des zentralen Nervensystems und in geringerem Ausmaß auf Astrozyten beschränkt.

Aufgrund der resultierenden APP-Überexpression zeigen TgCRND8-Mausgehirne bereits ab dem dritten Lebensmonat charakteristische A β -Plaques. Zeitgleich lassen sich im Morris-Water-Maze-Test Defizite im räumlichen Lernen nachweisen (Chishti et al., 2001). Das geschilderte kognitive Defizit und die Histologie entspricht somit dem klinischen und neuropathologischen Bild der Alzheimer-Krankheit des Menschen, sodass dieses Mausmodell geeignet ist entsprechende Experimente durchzuführen.

Männliche und weibliche transgene Mäuse wurden jeweils im Vergleich zu ihren gleichaltrigen und gleichgeschlechtlichen wildtypischen Geschwistern betrachtet.

Um die Proteine ApoER2 und Dab1 in unterschiedlichen Stadien der Krankheitsprogression untersuchen zu können, war eine erste Gruppe von transgenen sowie wildtypischen Mäusen bereits nach 30 Tagen, das heißt vor Krankheitsbeginn, eine zweite nach 90 Tagen, etwa bei Krankheitsausbruch, und eine dritte nach 210 Tagen, also in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, dekapitiert worden.

Die Tiere waren unter S1-Bedingungen in transparenten Typ III-Käfigen in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung der medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster gehalten worden. Eine Tierversuchsgenehmigung im Sinne des §8 des Tierschutzgesetzes war für das hier durchgeführte Projekt nicht erforderlich gewesen; alle Experimente waren im Einklang mit den Tierschutzrichtlinien (86/609/EEC) durchgeführt worden.

Die von der Alzheimer-Pathologie frühzeitig betroffenen Gehirnareale Frontalkortex, Entorhinalkortex und Hippocampus wurden jeweils getrennt voneinander untersucht.

Pro Protein ergaben sich folglich 18 Gruppen (eingeteilt nach Genotyp, Alter und Gehirnareal), die jeweils mindestens 6 Tiere enthielten (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Anzahl der untersuchten Tiere pro Protein, Gehirnareal, Genotyp und Alter

Dab1	FC und EC	HC
tgP30	6-12	6
tgP90	6-12	6-7
tgP210	6-12	6-7
wtP30	6-12	6
wtP90	6-12	6
wtP210	6-12	6

ApoER2	FC und EC	HC
tgP30	6-9	6
tgP90	6-9	6
tgP210	6-9	6
wtP30	6-9	6
wtP90	6-9	6
wtP210	6-9	6

2.2. Fixierung von Gehirnen

Nach erfolgter Genotypisierung (am 21. Lebenstag) und Dekapitierung in entsprechendem Alter (s. oben) wurden Hippokampus, Frontal- und Entorhinalkortex freipräpariert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Diese Schritte waren im Rahmen von Vorarbeiten erfolgt.

Anschließend wurden RNA, DNA und Proteine mittels TRIzol® *reagent* (Invitrogen, Karlsruhe) extrahiert.

2.3. Extraktion mit TRIzol® reagent

Die hier angewendete sogenannte „Single-Step“-Methode nach Chomczynski und Sacchi beruht auf der unterschiedlichen Löslichkeit der verschiedenen Biomoleküle. RNA, DNA und Proteine sind schließlich in unterschiedlichen Phasen zu finden.

Zunächst wurde das Gewebe in 800 µl TRIzol® reagent zweimal 40 s bei 3000 rpm unter Verwendung eines Mikrodismembrators (Sartorius AG, Göttingen) homogenisiert, Zellen werden hierbei lysiert und RNasen denaturiert. Nach 5-minütiger Inkubation in weiteren 800 µl TRIzol® reagent wurden 200 µl Chloroform hinzugeben, das Gemisch 2-3 min bei RT inkubiert und 15 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Bei den nun sichtbaren drei Phasen befindet sich die RNA in der oberen wässrigen Phase und die DNA in der Interphase. Proteine verbleiben in der unteren Trizol/Chloroform-Phase.

Die RNA kann nun in ein separates Gefäß überführt und gefällt werden: Es wurden 800 µl Isopropylalkohol hinzugefügt, das Gemisch geschüttelt, 10 min bei RT inkubiert und 30 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Bei sichtbarem RNA-Pellet wurde anschließend der Überstand abgezogen und verworfen. Im nächsten Schritt wurde das Pellet zwei Mal mit jeweils 1 ml 80 % Ethanol (in DEPC-Wasser) gewaschen, anschließend getrocknet und danach in 20 µl DEPC-Wasser gelöst. Die entstandenen RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

Beim Arbeiten mit RNA wurden stets RNase-freie Pipettenspitzen und Eppendorfgefäße verwendet, das Gefäß des Mikrodismembrators vor Gebrauch mit RNaseZap® Solution (Ambion Inc., Austin, TX, USA) gereinigt und Proben auf Eis zwischengelagert.

Die RNA wurde für andere Fragestellungen verwendet (s. Herring et al., 2012).

2.3.1. DNA-Isolation

Zur verbleibenden organischen Phase und Interphase aus der ersten Phasentrennung wurden 480 µl 100 % Ethanol gegeben. Das Gemisch wurde invertiert, für 2 min bei RT inkubiert und für 5 min bei 5000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Die Proteine befinden sich nun im hierdurch entstandenen Überstand, der zu gleichen Teilen in zwei neue Gefäße überführt wurde.

Das DNA-Pellet wurde auf -80°C gelagert und für weitere Untersuchungen (Herring et al., 2012) verwendet.

2.3.2. Proteinextraktion

Zu dem Überstand aus der DNA-Isolation wurden 2,4 ml Isopropylalkohol gegeben, die Probe wurde gemischt, für 10 min bei RT inkubiert und für 10 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde verworfen und das Protein-Pellet dreimal in je 800 µl 0,3 M Guanidinhydrochlorid Lösung (in 95 % Ethanol) und danach in 800 µl 100 % Ethanol gewaschen. Im Anschluss wurden die jeweiligen zwei Proben zusammengeführt, vorsichtig mit Zellstoff abgetupft, mit einer Kanüle zerkleinert und bei 40°C für ca. 15-20 min trocknen gelassen.

Zum Lösen des Proteinpellets wurden für die Areale Frontalkortex und Entorhinalkortex 800 µl, für den Hippokampus 600 µl 1 % SDS hinzugegeben und die Proben bei 40°C auf dem Heizblock inkubiert. Zwischendurch wurden die Proben mit Ultraschall beschallt. Gelöste Proben wurden anschließend auf -80°C gelagert.

2.4. Immunblot (Western Blot)

Um die Proteine ApoER2 und Dab1 spezifisch nachzuweisen und semiquantitativ zu analysieren, wurden Immunblots durchgeführt.

Hierbei werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das entsprechende Bandenmuster bleibt dabei 1:1 erhalten. Dadurch werden die Proteine zugänglich für die Detektion mit spezifischen Antikörpern.

Bei der Bestimmung des Proteingehalts an ApoER2 bzw. Dab1 wurden alle Ergebnisse auf β -Aktin normiert. Da das Aktin-Gen konstitutiv exprimiert wird, ist Aktin hierfür geeignet.

2.4.1. Probenvorbereitung

Die Proteinkonzentrationen der Proben waren bereits in Vorarbeiten durch Lowry bestimmt worden. Um identische Proteinkonzentrationen in allen Proben zu erhalten, wurden diese entsprechend mit Lysispuffer (s. Tabelle 3) verdünnt, sodass jede Probe schließlich 20 μ g Protein bei einem Endvolumen von 25 μ l enthielt. Zeitgleich wurde eine Verdünnungsreihe aus allen für dieses Protein und Areal verwendeten Proben angesetzt: Die jeweiligen Konzentrationen betrugen 40, 20 und 10 μ g Protein pro 25 μ l Probe. Für Aktin wurden jeweils 4 μ g Protein / 25 μ l Probe und eine Verdünnungsreihe mit jeweils 8, 4 und 2 μ g/ 25 μ l Probe angesetzt, weil bei diesen Konzentrationen ein spezifischeres Antikörpersignal erzielt werden konnte.

Vor der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine zudem mit 5 x Auftragspuffer (s. Tabelle 3) behandelt und für 5 Minuten auf

95°C erhitzt, um die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine zu denaturieren.

5 x SDS enthielt außerdem Bromthymolblau, um die Probe im Gel sichtbar zu machen.

Fertig angesetzte Proben wurden stets bei -20°C zwischengelagert.

2.4.2. Gelelektrophorese

Durch SDS werden Unterschiede in der Eigenladung der verschiedenen Proteine aufgehoben, sodass die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine zur Anode nun ausschließlich proportional zu deren Molekulargewicht ist. Folglich werden die Proteine bei diesem Verfahren entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Es wurden für beide Proteine diskontinuierliche SDS-PAGEs durchgeführt (Laemmli et al., 1970).

Zunächst wurden die SDS-Polyacrylamidgele hergestellt (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

Sammelgel (4 %)	Trenngel (10 %)
415 µl Acrylamid/Bisacrylamid	2330 µl Acrylamid
625 µl Upper Tris	1750 µl Lower Tris
1460 µl Aqua dest.	2920 µl Aqua dest.
20 µl APS (10 %)	50 µl APS (10 %)
5 µl Temed	10 µl Temed

Die Chemikalien wurden unter ständigem Rühren zusammenpipettiert; in das noch flüssige Sammelgel wurde ein zehnzähniger Kamm eingesetzt, der erst kurz vor der Beladung des Gels mit Proben wieder aus diesem entfernt wurde. Trenn- und Sammelgel wurden jeweils mindestens 30 min lang bis zur vollständigen Polymerisation stehen gelassen. Fertige Gele wurden bei 4°C gelagert.

Tabelle 3: Verwendete Puffer/Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Standard Lysispuffer	10 mM Tris/HCL, pH 8,0
	150 mM NaCl
	2 % Igepal
	1 % Na-Desoxycholat
	1 mM EDTA

	1 mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N'-Tetraessigsäure (EGTA)
5 x Auftragspuffer	60 mM Tris, pH 6.8 10 % Glycerol 2 % SDS 5 % beta-Mercaptoethanol 0,05 % Bromphenolblau
10 x SDS-Laufpuffer	1,92 M Glycin 322 mM Tris 66 mM SDS
Proteinmarker	Prestained protein ladder (10-230 kDa; New England Biolabs)

Bevor die Proteinproben in die Geltaschen pipettiert wurden, wurde die Elektrophoresekammer mit 1 x SDS Laufpuffer (s. Tabelle 3) gefüllt. In die jeweils erste Geltasche wurden 5 µl eines Proteinstandartmarkers (s. Tabelle 3) pipettiert, mit dessen Hilfe das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine ermittelt werden kann. Nach Beladung der übrigen Geltaschen mit Proteinproben wurde für 1 h (für Dab1) bzw. 1,5 h (für ApoER2) bzw. 45 min (für Aktin) eine Elektrophoresespannung von konstant 130 V angelegt.

2.4.3. Proteintransfer

Es wurde das Tank-Blot-Verfahren angewendet: In einer Blotting-Kammer wandern die Proteine in einem senkrecht zum Polyacrylamidgel gerichteten elektrischen Feld aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Protran Nitrocellulose Membrane Filters, Whatman, Porengröße 0,2 µm, VWR International GmbH, Darmstadt).

Vor dem Blotting wurden die Gele 15 min bei RT in 1 x Blotpuffer (s. Tabelle 4) gewaschen, Nitrocellulosemembranen, Filter und Schwämme wurden ebenfalls in 1 x Blotpuffer äquilibriert. In der Blottingkammer wurde das Gel in Richtung der Kathode, die Nitrocellu-

losemembran in Richtung der Anode ausgerichtet und die entsprechende Spannung angelegt (Für Dab1: 100 V für 1 h; Für ApoER2: 130 V für 1,5 h; Für Aktin: 130 V für 1 h). Der Proteintransfer fand bei konstant 4°C statt. Die nun proteinbeladene Nitrocellulosemembran wurde anschließend für ca. 5 min mit 1 x TST gewaschen und danach für 5 min mit Ponceau S (s. Tabelle 4) inkubiert um den erfolgreichen Transfer der Proteine auf die Membran nachzuweisen.

Tabelle 4: Verwendete Puffer/Lösungen für den Proteintransfer

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Blotpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris 20 % Methanol
Ponceau-Lösung (5 % Stock)	0,7 mM Ponceau S 1 % Eisessig

2.4.4. Proteindetektion durch spezifische Antikörper

Die nachzuweisenden Proteine werden hierbei hochspezifisch von entsprechenden Antikörpern (Primärantikörper) gebunden. Im nächsten Schritt bindet ein enzymgekoppelter (Meerrettichperoxidase) Sekundärantikörper an ersteren. Es wird nun das Substrat Luminol zugegeben, das durch Enzymwirkung zu einem chemolumineszierenden Produkt umgesetzt wird. Das resultierende Chemilumineszenzsignal ist proportional zum gebundenen Antikörper und folglich auch zum in der Probe enthaltenen Proteingehalt.

Um eine unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden, wurde die Membran jeweils vor Antikörperinkubation mit 5 % Magermilchpulver (Fluka, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) in TST-Lösung für 30 min (bei Dab1 und Aktin) bzw. 45 min (bei ApoER2) blockiert, mögliche unspezifische Bindungsstellen werden hierbei abgesättigt.

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

	Aktin	Dab1	ApoER2
Primärantikörper (Bezeichnung; Spezies; Hersteller; Verdünnung)	A5441; Maus; Sigma-Aldrich; 1:15000	D1569; Kaninchen; Sigma-Aldrich; München; 1:2000	ab52905; Kaninchen; abcam, Cambridge, UK; 1:100
Sekundärantikörper (Bezeichnung; Spezies; Hersteller; Verdünnung)	A3682 (Anti-mouse); 1:30000	111-035-005 (Anti-rabbit); 1:5000	111-035-005 (Anti-rabbit); 1:1000

Die Inkubation mit Primärantikörper fand über Nacht bei 4°C und unter ständigem Invertieren (Schüttler) statt. Die Behandlung mit Sekundärantikörper erfolgte bei RT für 1 h ebenfalls unter ständigem Invertieren. Nach Primärantikörperinkubation wurden die Membranen zweimal, nach Sekundärantikörperinkubation dreimal für jeweils 10 min in 1 x TST gewaschen.

Im nächsten Schritt wurde nun je 1 ml von beiden Komponenten des ECL-Kits (Bio Rad, München) (für Dab1) bzw. des Immobilon-Kits (Millipore, USA) (für Aktin und ApoER2) für 1 min auf die Membran gegeben.

Die Chemilumineszenzsignale wurden mit dem Chemidoc XRS Dokumentationssystem (Bio Rad, München) erfasst. Die hochauflösende Kamera dieses Systems wird durch die Software Quantity One (Bio Rad, München) gesteuert; Expositionszeit, Fokussierung und Zoom können hiermit entsprechend adaptiert werden. Die Membranen werden auf den Transluminator des Systems aufgelegt und so in die Dunkelkammer des Systems eingebracht. Für jedes nachzuweisende Protein wurden jeweils optimale Expositionszeiten ermittelt.

Die so generierten Bilder wurden mit der Software Image Lab 2.0 (Bio Rad, München) analysiert: Die Bandendicke wird hierbei densitometrisch in entsprechende Zahlenwerte umgerechnet. Alle relativen Zahlenwerte der Proteine Dab1 und ApoER2 wurden zu den entsprechenden β -Aktin-Werten in Bezug gesetzt und so normalisiert.

Um eine höhere Reliabilität der Ergebnisse zu erzielen, wurden von allen Immunblots Triplets angefertigt und bei signifikanter Divergenz der Ergebnisse ein vierter Blot analysiert.

2.5. Statistik

Alle Datensätze wurden mittels des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests auf Normalverteilung überprüft. Varianzhomogenität wurde im Levene-Test festgestellt. Bei normalverteilten Datensätzen wurde eine zweifaktorielle Analysis of variance (ANOVA), bei nicht parametrischen Datensätzen der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Als post hoc Test zur Bestimmung der paarweisen Unterschiede wurde der studentische T-Test und eine Fisher's least significant difference (LSD)-Analyse durchgeführt.

Als signifikant wurden Unterschiede bei $p \leq 0,05$ betrachtet. Für alle statistischen Tests wurde die Software SPSS (Version 17, IBM Company, New York, USA) verwendet.

3. Ergebnisse

Kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass der Reelingehalt bei transgenen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen bereits in einem sehr frühen Stadium im Verlauf der Alzheimer-Pathologie reduziert ist. Eine reduzierte Reelinexpression konnte bereits vor dem Auftreten morphologischer Korrelate, d.h. noch vor der Detektierbarkeit von β -Amyloid-Plaques nachgewiesen werden (Herring et al., 2012).

Um zu untersuchen, ob nicht nur Reelin, sondern darüber hinaus auch die Reelin-Signalkaskade im transgenen Mausmodell durch die Alzheimer-Pathologie beeinträchtigt ist, wurde die Expression der nachgeschalteten Proteine Dab1 und ApoER2 bei transgenen im Vergleich zu gleichaltrigen und -geschlechtlichen Wildtyp-Mäusen analysiert.

Der Proteingehalt an Dab1 bzw. ApoER2 wurde jeweils separat in den von der Alzheimer-Pathologie betroffenen Gehirnarealen Hippokampus, Entorhinalkortex und Frontalkortex bei transgenen und wildtypischen Mäusen durch Immunblotanalysen bestimmt.

Ferner wurde die Proteinexpression zu drei verschiedenen Zeitpunkten im Fortschreiten der Alzheimerpathologie untersucht, indem Immunblots bei sowohl 30, 90, als auch 210 Tage alten Mäusen durchgeführt wurden, mit dem Ziel, den Einfluss des Alters per se, wie auch in Wechselwirkung mit der Alzheimerpathologie quantifizieren und beurteilen zu können.

Die drei untersuchten Zeitpunkte waren so gewählt, dass sie drei morphologisch unterschiedliche Stadien der Erkrankung erfassten, da bei 30 Tage alten transgenen Mäusen noch keine β -Amyloid-Pathologie nachweisbar ist, während sie bei 90 Tage alten Mäusen im Entstehungsprozess begriffen und nach 210 Tagen voll ausgeprägt ist.

Der Proteingehalt an Dab1 und ApoER2 wurde zudem gesondert bei männlichen und weiblichen Tieren analysiert. Da sich das Expressionsmuster beider Proteine jedoch als geschlechtsunabhängig herausstellte, finden sich im Folgenden die zusammengefassten Daten beider Geschlechter. Alle abgebildeten Western-Blot-Daten wurden gegen das Housekeeping-Protein Aktin normiert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM.

3.1. Analyse der Dab1-Expression

Dab1 ist das erste intrazelluläre Adapterprotein im Reelin-Signalweg, dessen Analyse als solches geeignet ist, mögliche Veränderungen der Signalkaskade festzustellen.

3.1.1. Altersabhängige Abnahme der Dab1-Expression bei transgenen und Wildtyp-Mäusen im Hippokampus

Im Hippokampus konnte sowohl bei transgenen als auch bei Wildtyp-Mäusen eine altersabhängige Abnahme des Dab1-Gehalts beobachtet werden ($p = 0,001$, $F_{2,33} = 11,14$).

Bei transgenen Mäusen war die Dab1-Reduktion bereits bei 90 Tage alten im Vergleich zu 30 Tage alten Tieren signifikant (TG P30 vs. TG P90: -34 %, $p = 0,042$, $F_{5,30} = 3,14$; TG P30 vs. TG P210: -40 %, $p = 0,02$), allerdings zeigte sich zwischen 90 und 210 Tage alten Mäusen keine weitere signifikante Abnahme. Bei Wildtyp-Mäusen fiel ein signifikanter Unterschied erst bei 210 Tage alten im Vergleich zu 30 Tage alten Tieren auf (WT P30 vs. WTP210: -49 %, $p = 0,007$). Ein signifikanter Unterschied bezüglich des Dab1-Gehalts zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen konnte nicht detektiert werden.

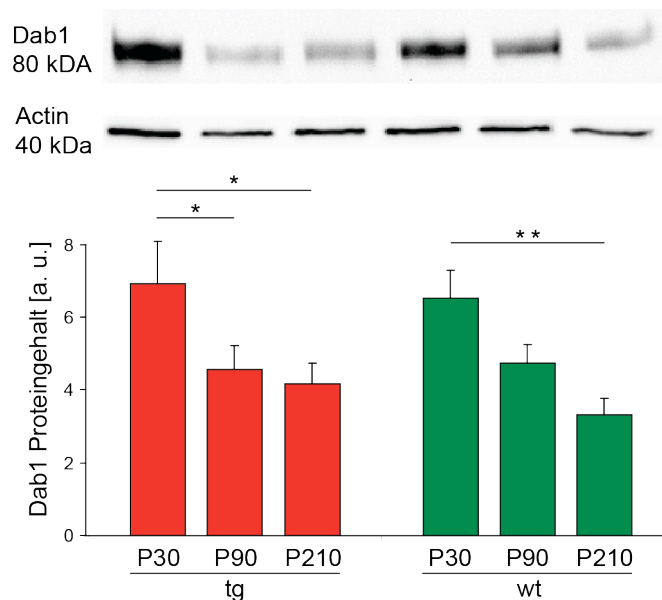


Abbildung 4: Dab1-Expression im Hippokampus. Es zeigt sich eine altersabhängige Abnahme bei transgenen sowie Wildtyp-Mäusen. Tg = transgen, wt = Wildtyp; P30/P90/P210 = 30/90/210 Tage alte Mäuse; Normierung gegen Aktin; dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM; Statistik mittels ANOVA mit LSD als post hoc; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$; a .u. = arbitrary units.

3.1.2. Altersabhängige Abnahme der Dab1-Expression bei transgenen Mäusen im Entorhinalkortex

Im Entorhinalkortex fiel eine altersabhängige Abnahme der Dab1-Expression ausschließlich bei den transgenen Tieren auf. Diese war signifikant ab dem Zeitpunkt P210 im Vergleich zu P30 (TG30 vs. TG90: -25 %, $p = 0,057$, $F = 1,41$; TG P30 vs. TG P210: -30 %, $p = 0,027$) und somit erst später als die entsprechende alterabhängige Dab1-Abnahme bei transgenen Mäusen im Hippokampus.

Bei Wildtyp-Mäusen war hier über alle drei Altersstadien keine signifikante Veränderung feststellbar.

Auch im Entorhinalkortex wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen bemerkt.

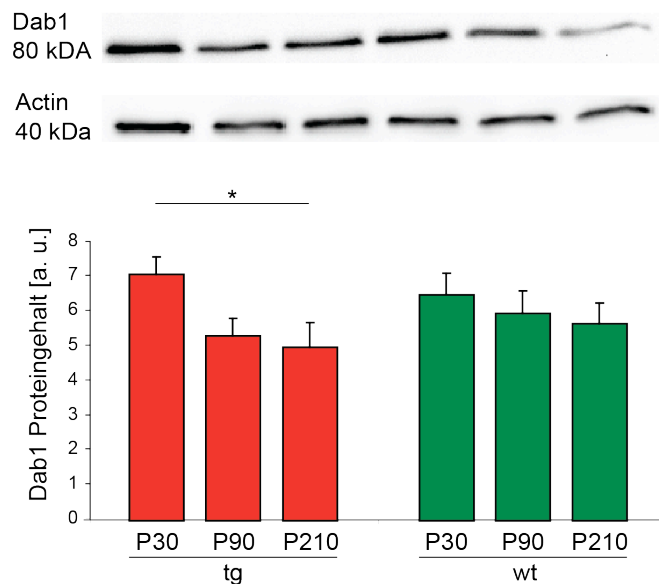


Abbildung 5: Dab1-Expression im Entorhinalkortex. Es findet sich eine altersabhängige Abnahme der Dab1-Expression ausschließlich bei transgenen Tieren. Tg = transgen, wt = Wildtyp; P30/P90/P210 = 30/90/210 Tage alte Mäuse; Normierung gegen Aktin; dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM; Statistik mittels ANOVA mit LSD als post hoc; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$; a .u. = arbitrary units.

3.1.3. Dab1-Expression im Frontalkortex: Genotyp- und altersunabhängig

Weder Transgenität noch Alterungsprozesse führten im Frontalkortex zu veränderten Dab1-Werten. Zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen, gleichermaßen wie zwischen unterschiedlich alten Tieren des gleichen Genotyps waren keine signifikanten Unterschiede vermerkbar.

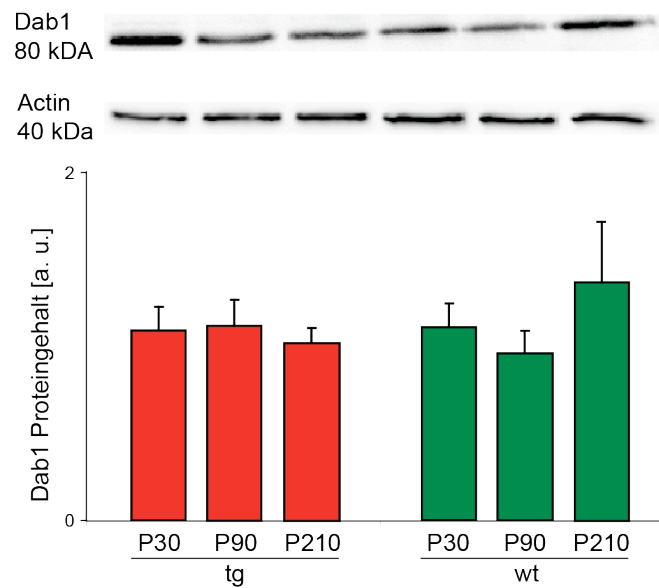


Abbildung 6: Dab1-Expression im Frontalkortex. Alter wie Genotyp nehmen hier keinen Einfluss auf die Proteinexpression. Tg = transgen, wt = Wildtyp; P30/P90/P210 = 30/90/210 Tage alte Mäuse; Normierung gegen Aktin; dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM; Statistik mittels ANOVA mit LSD als post hoc; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$; a .u. = arbitrary units.

3.2. Analyse der ApoER2-Expression

ApoER2 ist neben VLDLR einer der Rezeptoren für Reelin. Durch die direkte Interaktion dieser beiden Moleküle ist dessen Untersuchung für die Beurteilung des Reelinsignalwegs ebenfalls essentiell.

3.2.1. Altersabhängige Reduktion der ApoER2-Expression bei transgenen und Wildtyp-Mäusen im Hippokampus

Die Quantifikation der ApoER2-Expression im Hippokampus zeigte bei beiden Genotypen eine altersabhängige Verringerung ($p < 0.001$, $F_{2,33} = 22,38$).

Bei transgenen Mäusen war hier ein signifikanter Unterschied zwischen 30 und 210 Tage alten Tieren erkennbar (TG P30 vs. TG P210: -50 %, $p = 0,02$, $F_{5,30} = 4,49$). Bei Wildtyp-Mäusen war die Differenz sowohl zwischen 30 und 210 Tage alten als auch zwischen 90 und 210 Tage alten Tieren signifikant (WT P30 vs. WT P210: -82 %, $p = 0,001$).

Zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

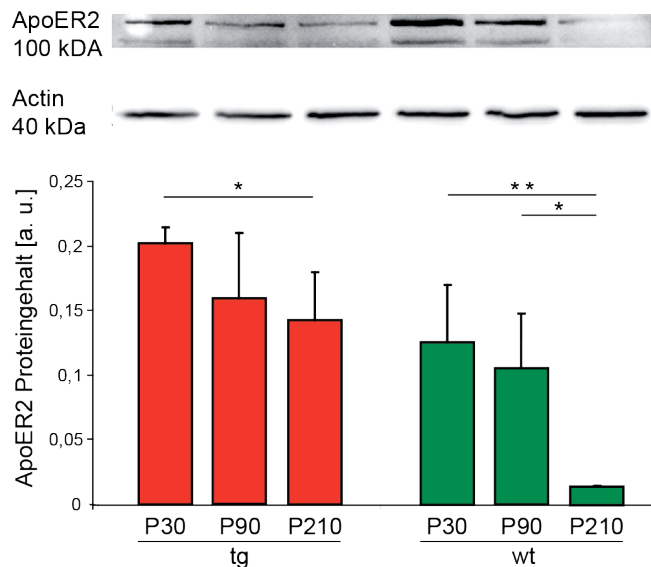


Abbildung 7: ApoER2-Expression im Hippokampus. Es zeigt sich eine altersabhängige Abnahme der Proteinexpression bei beiden Genotypen. Tg = transgen, wt = Wildtyp; P30/P90/P210 = 30/90/210 Tage alte Mäuse; Normierung gegen Aktin; dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM; Statistik mittels ANOVA mit LSD als post hoc; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$; a .u. = arbitrary units.

3.2.2. Kein Einfluss von Genotyp oder Alter auf die ApoER2-Expression im Frontal- und Entorhinalkortex

Im Entorhinal- wie im Frontalkortex waren zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der ApoER2-Expression eruierbar.

Auch Alterung führte weder bei transgenen noch bei Wildtyp-Mäusen zu feststellbaren Veränderungen.

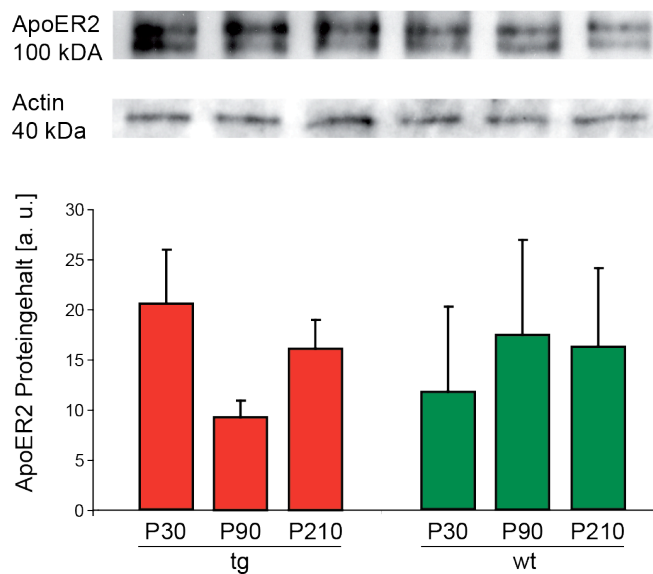


Abbildung 8: ApoER2-Expression im Entorhinalkortex. Weder Alter noch Genotyp zeigen eine Auswirkung auf die Proteinexpression. Tg = transgen, wt = Wildtyp; P30/P90/P210 = 30/90/210 Tage alte Mäuse; Normierung gegen Aktin; dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM; Statistik mittels ANOVA mit LSD als post hoc; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$; a .u. = arbitrary units.

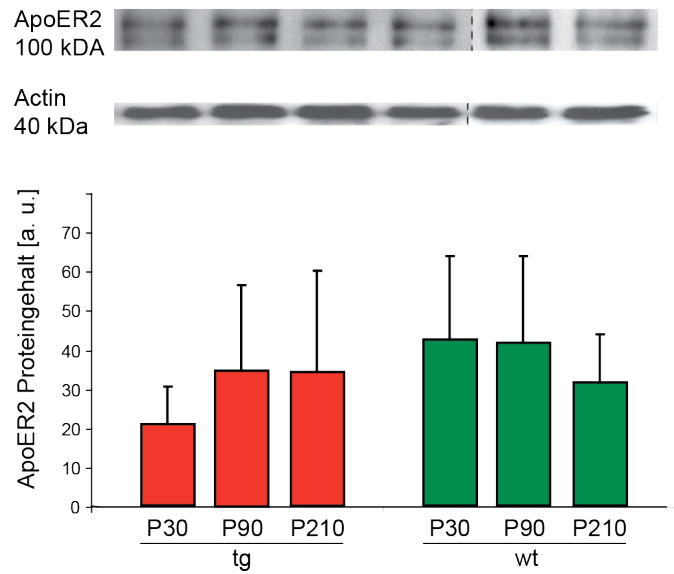


Abbildung 9: ApoER2-Expression im Frontalkortex. Weder Alter noch Genotyp zeigen eine Auswirkung auf die Proteinexpression. Tg = transgen, wt = Wildtyp; P30/P90/P210 = 30/90/210 Tage alte Mäuse; Normierung gegen Aktin; dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM; Statistik mittels ANOVA mit LSD als post hoc; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$; a .u. = arbitrary units.

3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Quantifikation der Proteinexpression von Dab1 und ApoER2 zeigte in allen untersuchten Gehirnarealen (Hippokampus, Entorhinalkortex und Frontalkortex) keine signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen.

Im Hippokampus war eine altersabhängige Abnahme des Gehalts beider Proteine beobachtbar.

Im Entorhinalkortex zeigte sich eine altersabhängige Expressionsreduktion nur von Dab1 und ausschließlich bei transgenen Tieren.

Im Frontalkortex blieb das Expressionsmuster beider Proteine von Alterung unbeeinflusst.

4. Diskussion

Assoziationen des Reelin-Signalwegs mit der Alzheimer-Pathologie wurden bereits vielfach aufgezeigt (s. o.). Kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Reelin-expression bei transgenen Alzheimer-Mäusen schon im Alter von 30 Tagen, das heißt noch vor dem Auftreten der charakteristischen Neuropathologie, vermindert ist (Herring et al., 2012).

Diese Erkenntnis impliziert die Möglichkeit, Reelin zukünftig als präklinischen Marker für die Alzheimer-Krankheit verwenden zu können. Insbesondere dann, falls sich ein verringerter Reelingehalt auch im Plasma nachweisen ließe, käme dieser Möglichkeit eine beträchtliche Relevanz zu.

Die Frage, ob Reelin somit als Screening-Marker in einem prä-symptomatischen Krankheitsstadium eingesetzt werden könnte, um frühzeitig entsprechende diagnostische wie therapeutische Schritte einzuleiten, erfordert jedoch gewiss weitere umfangreiche Untersuchungen: Lässt sich eine Reelinreduktion in der Tat unkompliziert im Plasma nachweisen? Ferner, ist ein im Plasma veränderter Reelingehalt auf eine Reduktion des aus dem Gehirn stammenden Reelins zurückzuführen? Bezüglich dieser Frage könnten Analysen des Glykosylierungsmusters von Reelin aussichtsreich sein. Wie sensitiv verhält sich der Plasma-Reelinspiegel und wie spezifisch ist ein verringertes Plasma-Reelin für das Vorliegen der Alzheimer-Krankheit? Um nur einige wenige zu klärende Fragestellungen anzureißen.

Zugleich stellt sich die Frage, ob auch andere Moleküle der Reelin-Signalkaskade, respektive Dab1 oder ApoER2, als potentielle präklinische Markerproteine der Alzheimer-Krankheit dienen könnten. Lassen sich die frühzeitigen Veränderungen der Reelinexpression auf der Ebene nachgeschalteter Signalmoleküle weiterverfolgen? Folgt aus einer verringerten Expression des Signalmoleküls Reelin eine verringerte Aktivität der Signalkaskade? Sind Dab1 und ApoER2 gleichsinnig oder gegensinnig zu Reelin verändert? Könnten Veränderungen im Reelin-Signalweg eine ursächliche Rolle in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit spielen? Oder treten diese vielmehr als Folge anderer pathogenetischer Faktoren auf?

Um zu einer Antwort auf jene Fragen beizutragen, wurden hier in einem transgenen Mausmodell die Expressionsprofile von Dab1 und ApoER2 im Prozess der Alterung sowie

der Krankheitsentstehung im Hippokampus, im Entorhinalkortex und im Frontalkortex analysiert.

Die Proteinexpression wurde bei beiden Genotypen zu jeweils drei Zeitpunkten im Fortschreiten der Erkrankung bzw. des Alterungsprozesses untersucht: So kann sowohl der Einfluss der Alterung dargestellt als auch der Zeitraum angezeigt werden, in dem eventuell pathogenetisch relevante Veränderungen manifest werden. Die Analysen wurden in drei Alzheimer-relevanten Gehirnarealen durchgeführt, um aufzuzeigen, welche Areale anfänglich oder im Verlauf von alters- oder genotypenspezifischen Veränderungen betroffen sind.

4.1. Dab1-Expression

Beim Vergleich der Dab1-Expression von transgenen mit der von Wildtyp-Mäusen zeigte sich in allen untersuchten Hirnarealen kein signifikanter Unterschied. Anders als die Reelinexpression, die bei transgenen Tieren bereits im Alter von 30 Tagen signifikant verringert war (Herring et al., 2012), scheint die Expression des ersten intrazellulären Adapterproteins der Signalkaskade somit von der Alzheimer-Pathologie unbeeinträchtigt zu bleiben. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Untersuchungen, die an humanen Gehirnen durchgeführt wurden: Dab1 fand sich im Frontalkortex von Patienten mit der Alzheimer-Krankheit deutlich hochreguliert (Müller et al., 2011); unsere Arbeitsgruppe konnte im Hippokampus sowie im Entorhinalkortex humaner Gehirne eine Mehr-Expression von Dab1 nachweisen (Herring et al., 2012), was als Kompensationsversuch des abnehmenden Reelin-Signals verstanden werden könnte.

Die von Müller et al. geäußerte Vermutung, ein erhöhter Dab1-Gehalt könne über Interaktion mit der intrazellulären Domäne von APP zu einem veränderten Genexpressionsmuster führen oder mit dem physiologischen Ablauf der Reelin-Signalkaskade interferieren und dadurch für die Alzheimer-Krankheit pathogenetisch relevant sein, lässt sich folglich durch unsere Beobachtungen an einem transgenen Mausmodell nicht bestätigen.

Dementgegen könnte die nachgewiesene Interaktion von Dab1 mit der intrazellulären Domäne von APP dennoch pathophysiologisch bedeutsam sein, ohne dass hierfür eine veränderte Dab1-Expression vorausgesetzt wird.

Der Vergleich von Untersuchungen am Mausmodell mit Untersuchungen an menschlichen Gehirnen ist jedoch gewiss nicht unproblematisch (siehe auch unten): Insbesondere wurde bei unseren Untersuchungen ein jüngeres Alter beziehungsweise ein früheres Krankheitsstadium betrachtet als bei den entsprechenden Analysen von humanem Hirngewebe. Ein Anstieg der Dab1-Expression in einem weiter fortgeschrittenen Stadium der Alzheimer-Krankheit als hier betrachtet, wäre als Kompensationsversuch einer weiter abnehmenden Reelinexpression folglich durchaus vorstellbar.

Bislang gibt es ferner keine weiteren Untersuchungen der Dab1-Expression an transgenen Alzheimer-Mäusen, mit denen sich unser Ergebnis vergleichen ließe.

Im Hippokampus konnte bei beiden Genotypen eine altersabhängige Abnahme der Dab1-Expression beobachtet werden, die bei transgenen Tieren schon zu einem früheren Zeit-

punkt signifikant war. Diese altersabhängige Abnahme fand sich im Entorhinalkortex ausschließlich bei transgenen Mäusen. Im Frontalkortex blieb die Dab1-Expression im Zuge der Alterung unverändert. Alterungsprozesse scheinen ergo die Dab1-Expression zu beeinträchtigen. Dieser Effekt könnte wiederum mit der Alzheimerpathologie interagieren, da diese altersabhängige Beeinträchtigung im Hippokampus früher und im Entorhinalkortex ausschließlich bei transgenen Tieren auftritt.

Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass die Reelinexpression in gleicher Weise durch Alterung beeinflusst wird (Herring et al., 2012), weiter wurde eine positive Korrelation zwischen der Reelin- und der Dab1-Expression in allen untersuchten Arealen eruiert: Reelin und Dab1 könnten somit als funktionelle Einheit betrachtet werden.

Denkbar wäre jedoch auch, dass Mechanismen im Rahmen der Alterung primär eine Veränderung der Reelinexpression bedingen, was konsekutiv zu einem veränderten Dab1-Gehalt führt, wobei in diesem Fall zweifelsohne zu begründen bliebe, weshalb eine verringerte Reelinexpression im Zuge der Alterung, nicht aber im Zuge der Alzheimer-Pathologie Auswirkungen auf die Dab1-Expression hat.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Anzahl Reelin-exprimierender Neurone im Alter abnimmt (Kocherhans et al., 2011). Ein unspezifischer Untergang von Neuronen im Zuge der Alterung konnte hierbei durch immunhistochemische Untersuchungen ausgeschlossen werden (s. a. Herring et al., 2012). Demgemäß könnte man annehmen, dass auch dem verringerten Dab1-Gehalt vielmehr eine Abnahme der Expression während der Alterung zugrunde liegt als ein altersbedingter unspezifischer Neuronenverlust. Die errechnete positive Korrelation zwischen der Reelin- und der Dab1-Expression kann diese Ansicht noch bekräftigen.

Um die Aktivität der Reelin-Signalkaskade zu untersuchen, ist Dab1 gewiss nur eingeschränkt geeignet, da die Kinasekaskade erst durch die Phosphorylierung von Dab1 nach Reelinbindung und Clusterbildung der Rezeptoren angestoßen wird; die Analyse des Phosphorylierungsgrades von Dab1 könnte tiefere Einblicke in die Aktivität der Reelin-Signalkaskade gewähren und somit Aussagen über den konkreten Ablauf von Reaktionen bei höherem oder niedrigerem Reelin-Expressionslevel zulassen.

4.2. ApoER2-Expression

Die Analyse des Expressionsprofils von ApoER2 ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen transgenen- und Wildtyp-Mäusen. Dementsprechend scheint auch die ApoER2-Expression von der Alzheimer-Pathologie nicht beeinflusst zu werden.

Eine altersabhängige Abnahme der ApoER2-Expression zeigte sich im Hippokampus bei beiden Genotypen. Im Entorhinalkortex und im Frontalkortex fand sich die ApoER2-Expression unvermindert, auch zum spätesten untersuchten Zeitpunkt, bei 210 Tage alten Tieren.

Zumindest im Hippokampus scheint Alterung auf die ApoER2-Expression Einfluss zu nehmen, anders als im Falle von Dab1 scheint jedoch die Alzheimer-Pathologie hierauf keinen Effekt zu haben, da sich bei beiden Genotypen identische Veränderungen feststellen ließen. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Beobachtung, dass ApoER2 dem Untergang kortikospinaler Neurone im Zuge der physiologischen Alterung entgegenwirken kann. Umgekehrt zeigen ApoER2-defiziente Mutanten einen beschleunigten Neuronenverlust während der Alterung (Beffert et al., 2006). Diese Erkenntnis legt die Vermutung nahe, dass eine Abnahme der ApoER2-Expression im Hippokampus, einem frühzeitig von der Alzheimer-Pathologie betroffenen Hirnareal, den forcierten Neuronenuntergang im Krankheitsprozess begünstigen könnte. Die ApoER2-Abnahme könnte folglich prädisponierend für das Auftreten der Alzheimer-Krankheit wirken.

Unterstützt wird diese Annahme durch die nachgewiesene positive Korrelation der ApoER2-Expression mit der Reelin-Expression im Hippokampus, in dem eine Reelinabnahme der Manifestation der Alzheimerpathologie sogar vorausgeht.

Erwägenswert wäre sicherlich auch die Untersuchung der ApoER2-Expression an wiederum älteren Mäusen, um zu ermitteln, ob sich die beobachtete Abnahme bei weiter fortschreitender Alterung auch in andere Hirnareale fortsetzt.

Eine altersabhängige Abnahme der ApoER2-Expression wurde in menschlichem Gehirn bislang nicht festgestellt (Herring et al., 2012): Hier blieb die ApoER2-Expression während der Alterung unverändert. Auch an dieser Stelle sei jedoch auf die eingeschränkte Vergleichbarkeit der Untersuchungen an einem transgenen Mausmodell mit solchen an humanem Hirngewebe hingewiesen (s. u.).

4.3. Methodenkritik: Maus versus Mensch

Beobachtungen, die hier an einem transgenen Mausmodell gemacht wurden, sind gewiss nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar. Grund hierfür ist unter anderem, dass TgCRND8-Mäuse, die eine doppelte Mutation des humanen APPs aufweisen, somit ein Modell für die familiäre Alzheimer-Krankheit darstellen, die beim Menschen weniger als 5 % aller Alzheimer-Fälle ausmachen. Insbesondere, um Aussagen über mögliche pathogenetisch relevanten Mechanismen der sporadischen Alzheimer-Krankheit zu treffen, ist dieses Modell nur bedingt geeignet. Jedoch kann die Tatsache, dass die sporadische und die familiäre Alzheimer-Krankheit klinisch wie histologisch ununterscheidbar sind, dass somit die entsprechenden Mutationen offensichtlich Einfluss auf dieselben Mechanismen bzw. Kaskaden zu nehmen scheinen, die bei sporadischen Alzheimer-Fällen eine Rolle spielen, letztere Aussage relativieren.

Überdies lassen sich Erkenntnisse, die hier an 30 Tage alten Tieren gewonnen wurden, nicht zu einem bestimmten Krankheitsstadium des Menschen in Bezug setzen, da die Alzheimer-Krankheit des Menschen definitiv erst post mortem diagnostiziert werden kann und im präklinischen Stadium bislang nicht untersuchbar ist. Diese Problematik verdeutlicht allerdings umso mehr die Notwendigkeit, hier mit einem transgenen Mausmodell zu arbeiten, um überhaupt Untersuchungen der Alzheimer-Krankheit im präklinischen Stadium durchführen zu können. Trotz der nur bedingt möglichen speziesübergreifenden Vergleichbarkeit der Ergebnisse zeigte sich im Rahmen der Vorarbeiten die verringerte Reelinexpression im Hippokampus bei beiden Spezies als sehr frühes Ereignis im Krankheitsverlauf (Herring et al., 2012).

4.4. Schlussfolgerungen/Ausblick

Die Analysen der Expressionsprofile von Dab1 und ApoER2 im Progress des Alterns sowie der Alzheimer-Krankheit zeigten, dass beide Proteine als präklinische Marker der Erkrankung ungeeignet sind, insofern sie weder zu einem frühen noch zu einem späten Zeitpunkt im Krankheitsverlauf ein verändertes Expressionsmuster aufwiesen.

Eine krankheitsbedingt veränderte Aktivität des Reelin-Signalwegs kann somit jedoch nicht ausgeschlossen werden, da hier zwar die Expression einzelner Komponenten der Kaskade, nicht aber aktivitätsabhängig modifizierte Komponenten, wie beispielsweise phosphoryliertes Dab1, erfasst wurde.

Die bei transgenen Alzheimer-Mäusen nachgewiesene frühzeitig eingeschränkte Reelin-expression (Herring et al., 2012) könnte eine ursächliche Beteiligung des Reelin-Signalwegs in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit implizieren. Diese Ansicht wird durch die Beobachtung gestützt, dass reelindefiziente transgene Alzheimer-Mäuse ein beschleunigtes Fortschreiten der Alzheimerpathologie aufzeigten (Kocherhans et al., 2010).

Dass ferner auch Dab1 und ApoER2 im pathogenetischen Netzwerk der Alzheimer-Krankheit eine entscheidende Rolle spielen könnten, scheint angesichts der essentiellen Bedeutung dieser Proteine im Rahmen von Lern- und Gedächtnisleistungen durchaus denkbar:

Durch Interaktion mit dem NMDA-Rezeptor nimmt insbesondere ApoER2 Einfluss auf die synaptische Transmission bis hin zu Langzeitveränderungen synaptischer Stärke (Beffert et al., 2005, Hoe et al., 2006, Chen et al., 2005). Der Stellenwert, namentlich von Exon 19 des ApoER2-Gens, für die synaptische Plastizität wird durch die gestörte Lern- und Gedächtnisfunktion, die bei Knockout dieses Exons auftritt, umso mehr verdeutlicht (Beffert et al., 2005). Darüberhinaus spricht die nachgewiesene geringere amyloidogene APP-Prozessierung durch Interaktion von sowohl Dab1 als auch von ApoER2 mit APP für eine Verknüpfung dieser Kaskadekomponenten mit der Pathophysiologie der Alzheimer-Krankheit (Hoe et al., 2006, Hoe et al., 2005).

Da sich hier jedoch zu keinem Zeitpunkt eine krankheitsspezifische Veränderung der Dab1- oder ApoER2-Expression nachweisen ließ, scheint deren ursächliche Beteiligung an der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit indes unwahrscheinlich.

Diese Feststellung schmälert jedoch nicht die mögliche Bedeutung von Reelin oder des Reelin-Signals für die Pathogenese der Alzheimer-Krankheit.

Die Untersuchungen zeigen für beide Proteine eine Abnahme der Expression im Hippokampus bei fortschreitendem Alter. Bezüglich der Reelin-Expression wurde in diesem Areal die gleiche Beobachtung gemacht (Herring et al., 2012).

Die Analyse der Neurobiologie des Alterns, die Abgrenzung der physiologischen Alterung einerseits von neurodegenerativer Erkrankung andererseits, sowie die Beleuchtung von Wechselwirkungen zwischen beiden, gewinnen heute angesichts der steigenden durchschnittlichen Lebenserwartung weltweit zunehmend an Bedeutung.

Könnte eine Abnahme der Expression von Proteinen der Reelin-Signalkaskade als Erklärung für die physiologisch auftretende Einschränkung kognitiver Funktionen im Alter in Frage kommen? Wie ist die Rolle des Hippokampus, der hier ausschließlich diese Veränderung aufzeigt, in diesem Zusammenhang einzuschätzen? Könnte ferner ein verringertes Expressionsniveau von Dab1 bzw. ApoER2 im Zuge der Alterung eine Prädisposition für das Auftreten der Alzheimer-Krankheit schaffen?

Während des Alterungsprozesses treten im menschlichen Gehirn eine Vielzahl von Veränderungen auf: Sensorische, motorische und kognitive Funktionen zeigen sich bei fortschreitendem Alter beeinträchtigt (Hofer et al., 2003). Als molekularbiologische Erklärung hierfür kommen zahlreiche Veränderungen in Frage: Die Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase sowie das Ruhepotential nimmt im Alter ab (Tanaka et Ando, 1990). Es kommt zu einer Zunahme von oxidativem Stress (Serrano et Klann, 2004), einer gestörten Energiehomöostase (Ames, 2004), zu Akkumulation geschädigter Proteine bei oder neben einer Abnahme von proteasomaler Aktivität und Funktion (Doehner et al., 2012, Trojanowski et Mattson, 2003, Stolzing et Grune, 2003) und zu DNA-Schäden (Lu et al., 2004).

Die genannten sowie viele andere Prozesse können eine Anfälligkeit der Neurone für degenerative Vorgänge im Alter erklären, sodass es insbesondere bei zusätzlichen genetischen- oder Umweltfaktoren zu neuronalem Zelltod bzw. zum Ausbruch neurodegenerativer Erkrankungen kommt. In diesem Zusammenhang spielt die selektive Vulnerabilität einzelner Neuronenpopulationen eine entscheidende Rolle, in dem Sinne, dass degenerative Prozesse, die auch im Rahmen der physiologischen Alterung auftreten, verstärkt einzelne Neuronengruppen betreffen und so die entsprechenden Areale für entsprechende neurodegenerative Erkrankungen prädisponieren (Mattson et Magnus, 2006).

Die Alzheimer-Krankheit manifestiert sich frühzeitig unter anderem im Hippokampus. Die selektive Vulnerabilität dieses Gehirnareals besteht hier unter anderem in einem hohen Gehalt an NMDA-Rezeptoren, was eine gewisse Anfälligkeit für Exzitotoxizität bedingt (Mattson, 2003). Darüberhinaus konnten im Zuge der Alterung Störungen der Calciumhomöostase in Neuronen der CA1-Region des Hippokampus nachgewiesen werden (Toescu et al., 2004); erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentrationen können die Degeneration von Neuriten und ferner neuronalen Zelltod begünstigen, indem Proteasen aktiviert und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies induziert wird. Eine Dysregulation der Calciumkonzentration könnte auch für nachgewiesene Defizite der Langzeitpotenzierung im Alter verantwortlich sein (Dieguez et Barea-Rodriguez, 2004).

Eine altersabhängige Abnahme von Komponenten der Reelin-Signalkaskade im Hippokampus könnte ebenfalls zu LTP-Defiziten beitragen und darüber hinaus im Rahmen der Induktion selektiver neuronaler Vulnerabilität verstanden werden.

Der Hippokampus zeigt sich folglich – nicht zuletzt durch unsere Ergebnisse – als ein für Alterungsprozesse sensibles Hirnareal. Diese Annahme steht auch in Einklang mit einer Arbeit, die eine Zunahme von oxidativem Stress im Hippokampus während der Alterung aufzeigen konnte (Venkateshappa et al., 2012).

Eine Abnahme der Expression von Dab1 und ApoER2 oder fernerhin ein schwächer werdendes Reelin-Signal im Rahmen einer möglichen Herunterregulation sämtlicher Kaskadenkomponenten könnte zu einer Erklärung für kognitive Einschränkungen im Zuge der physiologischen Alterung beitragen. Diese Vermutung ließe sich dadurch bekräftigen, dass ein altersabhängiger neuronaler Zelluntergang als Ursache für die auftretende kognitive Einschränkung heute als weitgehend ausgeschlossen gilt (Burke et Barnes, 2006) und vielmehr von funktionellen Beeinträchtigungen insbesondere im Bereich des Hippokampus ausgegangen wird (Morrison et Hof, 1997).

Die Frage, inwiefern Alterung und Alzheimer-Krankheit miteinander interagieren, wurde bereits vielfach kontrovers diskutiert. In Anbetracht der exponentiellen Zunahme der Inzidenzrate der Alzheimer-Krankheit ab einem Alter von 65 Jahren ist es gewiss verlockend, beide Prozesse als Kontinuum aufzufassen. Unterschiede hinsichtlich der Klinik, der Histologie sowie molekularbiologischer Veränderungen sprechen jedoch gegen die Auffassung, Veränderungen im Zuge der Alterung als hinreichende oder notwendige Bedingung für das Auftreten der Alzheimer-Krankheit zu werten (Morrison et Hof, 1997).

Dennoch bedingen oxidativer und metabolischer Stress sowie eine gestörte zelluläre Stress-Adaptation im Alter eine Anfälligkeit der Neurone für degenerative Prozesse (Mattson et Magnus, 2006). Ein Phänomen im Zuge der Alterung, das eindrücklich mit neurodegenerativer Erkrankung verknüpft ist, besteht beispielsweise in der Akkumulation geschädigter Proteine, die unlösliche Aggregate bilden und sich in oder außerhalb von Zellen ablagern. Ursächlich könnte eine gestörte proteasomale Funktion sein (Stolzing et Grune, 2003), die bei der Alzheimer-Krankheit noch stärker beeinträchtigt ist (Lam et al., 2000). Diese altersabhängige Veränderung kann zu einer gestörten A β -Clearance bei der Alzheimer-Krankheit beitragen. Auch die Hyperphosphorylierung von τ wird durch altersassoziierte Veränderungen begünstigt (Stoothoff et Johnson, 2005).

Interessant in diesem Zusammenhang ist auch eine Arbeit, die eine Verbindung zwischen diesem Phänomen und der Reelin-Signalkaskade schafft: Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Entstehung Reelin-positiver Ablagerungen im Hippokampus ein neuropathologisches Merkmal von Alterung darstellt (Knuesel et al., 2009). Nun wurde nachgewiesen, dass intraneuronale Proteinakkumulation für neuronale Dysfunktion und Degeneration im Alter ursächlich in Frage kommt und die Extrusion geschädigter Proteine hierbei als protektiver Mechanismus alternder Neurone verstanden werden kann. Ferner können Reelin-positive Ablagerungen im Zuge der Alterung als Aggregationskern für weiter geschädigte Proteine fungieren und somit pathogenetische Prozesse weiter verstärken (Doehner et al., 2012). Hiermit wäre eine explizite Verbindung zwischen Alterung, Neurodegeneration und dem Reelin-Signalweg als interagierendem Faktor hergestellt.

Unsere Arbeitsgruppe hingegen konnte Reelin-positive Ablagerungen ausschließlich bei gleichzeitig vorliegender Alzheimer-Pathologie nachweisen, ein Widerspruch, der sich jedoch möglicherweise dadurch erklärt, dass diese Ablagerungen eventuell erst jenseits eines Alters von 210 Tagen auftreten.

Die Frage, inwieweit eine altersabhängige Abnahme von Dab1 und ApoER2 im Hippokampus prädisponierend für die Entstehung der Alzheimer-Krankheit sein könnte, lässt sich zu diesem Zeitpunkt sicherlich nur spekulativ beantworten.

Eine selektive Abnahme dieser Proteine, respektive von ApoER2, das dem Untergang kortikospinaler Neurone im Zuge der physiologischen Alterung entgegenwirken kann (Beffert et al., 2006) in einem Prädilektionsareal der Alzheimer-Krankheit, könnte allerdings nach dem Konzept der selektiven neuronalen Vulnerabilität bei entsprechender genetischer oder

äußerer Belastung für die Alzheimer-Krankheit prädisponieren, ohne jedoch hinreichende oder notwendige Bedingung zu sein.

Dass darüber hinaus ein beeinträchtigtes Reelin-Signal möglicherweise eine kausale Rolle im pathogenetischen Netzwerk der Alzheimer-Krankheit spielt, scheint angesichts der Minderung der Reelinexpression noch vor dem Auftreten neuropathologischer Merkmale der Erkrankung durchaus wahrscheinlich.

5. Zusammenfassung

Veränderungen im Reelin-Signalweg im Zusammenhang mit der Alzheimer-Pathologie wurden in den letzten Jahren mehrfach aufgezeigt. Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass respektive die Reelinexpression bereits vor dem Auftreten von A β -Plaques reduziert ist, was eine kausale Rolle des Signalwegs im pathophysiologischen Geschehen der Erkrankung impliziert.

Hier wurde untersucht, ob und inwiefern Dab1, das erste Adapterprotein in der Kaskade und ApoER2, ein Reelinrezeptor im Rahmen der Alzheimer-Pathologie verändert sind. In einem transgenen Mausmodell wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten, d. h. vor dem Auftreten erster pathologischer Veränderungen, währenddessen und in einem fortgeschrittenen Stadium, die Alzheimer-relevanten Gehirnareale Hippokampus, Entorhinalkortex und Frontalkortex bezüglich der Dab1- und ApoER2-Expression analysiert.

Ein bei Vorliegen der Alzheimer-Pathologie verändertes Proteinexpressionsprofil konnte nicht eruiert werden. Allerdings zeigte sich eine altersabhängige Verringerung beider Proteine im Hippokampus bei beiden Genotypen sowie eine altersabhängige Abnahme von Dab1 im Entorhinalkortex transgener Mäuse.

Folglich sind beide Proteine als mögliche präklinische Marker der Alzheimer-Krankheit ungeeignet; ferner ist von einem veränderten Expressionsmuster dieser beiden Proteine als kausalem Faktor in der Alzheimer-Pathogenese nicht auszugehen.

Die altersabhängige Reduktion der Proteinexpression in frühzeitig von der Alzheimer-Pathologie betroffenen Hirnarealen betont jedoch die selektive Vulnerabilität dieser Areale für degenerative Prozesse, gegebenenfalls als Prädisposition für neurodegenerative Erkrankungen.

Literaturverzeichnis

1. Alzheimer, A. (1911): Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie 4, 356-385.
2. Ames, B. N. (2004): Delaying the mitochondrial decay of aging. Ann. NY Acad. Sci. 1019, 406-411.
3. Bales, K. R., Verina T., Dodel, R. C., Du, Y., Altstiel, L., Bender, M., Hyslop, P., Johnstone, E. M., Little, S. P., Cummins, D. J., Piccardo, P., Ghetti, B., Paul, S. M. (1997): Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. Nat. Genet. 17(3), 263-264.
4. Beffert, U., Weeber, E. J., Durudas, A., Qiu, S., Masiulis, I., Sweatt, J. D., Li, W.-P., Adelmann, G., Frotscher, M., Hammer, R. E., Herz, J. (2005): Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor ApoER2. Neuron 47, 567-579.
5. Beffert, U., Farsian, F. N., Masiulis, I., Hammer, R. E., Yoon, S. O., Giehl, K. M., Herz, J. (2006): ApoE Receptor 2 Controls Neuronal Survival in the Adult Brain. Curr. Biol. 16, 2446-2452.
6. Bickel, H., Die Epidemiologie der Demenz, Deutsche Alzheimergesellschaft Selbsthilfe Demenz, FactSheet01, 2010.
7. Bickel, H., Demenzen im höheren Lebensalter: Schätzungen des Vorkommens und der Versorgungskosten, Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie, 2001. 34: p. 108-115.
8. Blennow, K., de Leon, M., Zetterberg, H. (2006): Alzheimer's disease. Lancet 368, 387-403.

9. Bliss, T. V., Collingridge, G. L. (1993): A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.
10. Botella-Lopez, A., Burgaya, F., Gavin, R., Garcia-Ayllon, M. S., Gomez-Tortosa, E., Pena-Casanova, J., Urena, J. M., Del Rio, J. A., Blesa, R., Soriano, E., Saez-Valero, J. (2006): Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5573-5578.
11. Brich, J., Shie, F. S., Howell, B. W., Li, R., Tus, K., Wakeland, E. K., Jin, L. W., Mumby, M., Churchill, G., Herz, J., Cooper, J. A. (2003): Genetic modulation of tau phosphorylation in the mouse. *J. Neurosci.* 23, 187-192.
12. Burke, S. N., Barnes, C. A. (2006): Neural plasticity in the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 30-40.
13. Burns, A., Iliffe, S. (2009): Alzheimer's disease. *BMJ.* 338,158.
14. Chen, Y., Beffert, U., Ertunc, M., Tang, T.-S., Kavalali, E. T., Bezprozvanny, I., Herz, J. (2005): Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons. *J. Neurosci.* 25(36), 8209-8216.
15. Chin, J., Massaro, C. M., Palop, J. J., Thwin, M. T., Yu, G. Q., Bien-Ly, N., Bender, A., Mucke, L. (2007): Reelin depletion in the entorhinal cortex of human amyloid precursor protein in transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 27, 2727-2733.
16. D'Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D. S., Sheldon, M., Curran, T. (1999): Reelin is a Ligand for Lipoprotein Receptors. *Neuron* 24, 471-479.
17. Deguchi, K., Inoue, K., Avila, W. E., Lopez-Terrada, D., Antalffy, B. A., Quattrocchi, C. C., Sheldon, M., Mikoshiba, K., D'Arcangelo, G., Armstrong, D. L. (2003): Reelin and Disabled-1 expression in developing and mature human cortical neurons. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62(6), 676-684.

18. Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde (DGPPN), Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN) (2009): S3-Leitlinie “Demenzen”.
19. Dieguez, D. J., Barea-Rodriguez, E. J. (2004): Aging impairs the late phase of long-term potentiation at the medial perforant path-CA4 synapse in awake rats. *Synapse* 52, 53-61.
20. Doehner, J., Genoud, C., Imhof, C., Krstic, D., Knuesel, I. (2012): Extrusion of misfolded and aggregated proteins – a protective strategy of aging neurons?. *Eur. J. Neurosci.* 35, 1938-1950.
21. Durakoglugil, M. S., Chen, Y., White, C. L., Kavalali, E. T., Herz, J. (2009): Reelin signaling antagonizes β -Amyloid at the synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15938-15943.
22. Falconer, D. (1951): Two new mutants, „trembler“ and „reeler“, with neurological actions in the house mouse (*mus musculus* L.). *J. Genét. (Paris)*, 192-201.
23. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2005.
24. Goedert, M. (1996): Tau protein and the neurofibrillary pathology of alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 17, 121-131.
25. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. m., Binder, L. I. (1986): Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein τ (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci* 83, 4913-4917.
26. Hamburg, M. (1963): Analysis of the postnatal developmental effects of “Reeler” a neurological mutation in mice. A study in developmental genetics. *Dev. Biol.* 19, 165-185.
27. Hardy, J., Selkoe, D. J. (2002): progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.

28. Herring, A. *, Donath, A. *, Steiner, K. M., Widera, M. P., Hamzehian, S., Kanakis, D., Koelble, K., Elali, A., Hermann, D. M., Paulus, W., Keyvani, K. (2012): Reelin depletion is an early phenomenon of Alzheimer pathology. *J. Alzheimers Dis.* 29, 1-17.

29. Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B. W., Goffinet, A., Mumby, M. C., Cooper, J. A., Herz, J. (1999): Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor2 induces tyrosine phosphorylation of Disabled-1 and modulates Tau phosphorylation. *Neuron* 24, 481-489.

30. Hoareau, C., Borrell, V., Soriano, E., Krebs, M. O., Prochiantz, A., Allinquant, B. (2008): Amyloid precursor protein cytoplasmatic domain antagonizes reelin neurite outgrowth inhibition of hippocampal neurons. *Neurobiol. Aging* 29, 542-553.

31. Hoe, H.-S., Wessner, D., Beffert, U., Becker, A. G., Matsuoka, Y., Rebeck, G. W. (2005): F-spondin interaction with the apolipoprotein E receptor ApoER2 affects processing of amyloid precursor protein. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9259-9268.

32. Hoe, H.-S., Tran, T. S., Matsuoka, Y., Howell, B. W., Rebeck, G. W. (2006a): Dab1 and Reelin effects on amyloid precursor protein and ApoEReceptor 2 trafficking and processing. *J. Biol. Chem.* 281(46), 35176-35185.

33. Hoe, H.-S., Pocivavsek, A., Chakraborty, G., Fu, Z., Vicini, S., Ehlers, M. D., Rebeck, G. W. (2006b): Apolipoprotein E receptor 2 interactions with the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* 281, 3425-3431.

34. Hofer, S. M., Berg, S., Era, P. (2003): Evaluating the interdependence of aging-related changes in visual and auditory acuity, balance and cognitive functioning. *Psychol. Aging* 18, 285-305.

35. Hong, S. E., Shugart, Y. Y., Huang, D. T., Shahwan, S. A., Grant, P. E., Hourihane, J. O'B., Martin, N. D. T., Walsh, M., Walsh, C. A. (2000): Autosomal recessive lis-

- sencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat. Genet.* 26, 93-96.
36. Howell, B. W., Hawkes, R., Soriano, P., Cooper, J. A. (1997): Neuronal positioning in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* 389, 733-737.
 37. Illenberger, S., Zheng-Fischhöfer, Q., Preuss, u., Stamer, K., Baumann, K., Trinczek, B., Biernat, J., Godemann, R., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E. (1997): The endogenous and cell cycle-dependent phosphorylation of tau protein in living cells: Implications for alzheimer's disease. *Mol Biol Cell* 9, 1495-1512.
 38. Jack, C. R., Knopman, D. S., Jagust, W. J., Shaw, L. M., Aisen, P. S., Weiner, M. W., Petersen, R. C., Trojanowski, J. Q. (2010): Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol.* 9, 119-128.
 39. Knuesel, I., Nyffeler, M., Mormede, C., Muhia, M., Meyer, U., Pietropaolo, S., Yee, B. K., Pryce, C. R., LaFerla, F. M., Marighetto, A., Feldon, J. (2009): Age-related accumulation of Reelin in amyloid-like deposits. *Neurobiol. Aging* 30, 697-716.
 40. Knuesel, I. (2010): Reelin-mediated signalling in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases. *Prog. Neurobiol.* 91(4), 257-74.
 41. Kocherhans, S., Madhusudan, A., Doehner, J., Breu, K. S., Nitsch, R. M., Fritschy, J.-M., Knuesel, I. (2010): Reduced Reelin expression accelerates amyloid- β plaque formation and Tau pathology in transgenic Alzheimer's disease mice. *J. Neurosci.* 30(27), 9228-9240.
 42. Lam, Y. A., Pickart, C. M., Alban, A., Landon, M., Jamieson, C., Ramage, R., Mayer, R. J., Layfield, R. (2000): Inhibition of the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 9902-9906.

43. Lambert de Rouvroit, C., de Bergeyck, V., Cortvrindt, C., Bar, I., Eeckhout, Y., Goffinet, A. M. (1999): Reelin, the extracellular matrix protein deficient in reeler mutant mice, is processed by a metalloprotease. *Exp Neurol.* 156, 214-217.
44. Lee, M. S., Kwon, Y. T., Li, M., Peng, J., Friedlander R. M., Tsai, L. H. (2000): Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nat* 405(6784), 360-4.
45. Lemere, C. A., Blusztajn, J. K., Yamaguchi, H., Wisniewski, T., Saido, T. C., Selkoe, D. J. (1996): Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol Dis* 3, 16-32.
46. Lu, T., Pan, Y., Kao, S. Y., Li, C., Kohane, I., Chan, J., Yankner, B. A. (2004): Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature* 429, 883-891.
47. Marcus, E. M., Jacobson, S. (2003): Integrated Neuroscience. A Clinical Problem Solving Approach. Berlin: Springer Verl. Extra Materials online: www.extras.springer.com/2003/978-1-4020-7164-5/CD/Pathology/Alzheimer (07.01.2013, 17:45)
48. Mattson, M. P. (2003): Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med.* 3, 65-94.
49. Mattson, M. P., Magnus, T. (2006): Ageing and neuronal vulnerability. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 278-294.
50. Merrick, S. E., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. (1997): Selective destruction of stable microtubules and axons by inhibitors of protein serine/ threonine phosphatases in cultured human neurons. *J. Neurosci.* 17(15), 5726-37.
51. Morrison, J. H., Hof, P. R. (1997): Life and Death of Neurons in the Aging Brain. *Science* 278, 412-419.

52. Motoi, Y., Itaya, M., Mori, H., Mizuno, Y., Iwasaki, T., Hattori, H., Haga, S., Ikeda, K. (2004): Apolipoprotein E receptor 2 is involved in neuritic plaque formation in APP sw mice. *Neurosci. Lett.* 368, 144-147.
53. Müller, T., Loosse, C., Schrötter, A., Schnabel, A., Helling, S., Egensperger R., Marcus, K (2011): The AICD interacting protein Dab1 is up-regulated in Alzheimer frontal cortex brain samples and causes deregulation of proteins involved in gene expression changes. *Curr. Alzheimer Res.* 8, 573-582.
54. Namba, Y., Tomonage, M., Kawasaki, H., Otomo, E., and Ikeda, K. (1991): Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral deosits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jacob disease. *Brain Res* 541, 163-166.
55. Niu, S., Renfro, A., Quattrocchi, C. C., Sheldon, M., D'Arcangelo, G. (2004): Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ ApoER2-Dab1-pathway. *Neuron* 41, 71-84.
56. Ohkubo, N., Lee, Y. D., Morishima, A., Terashima, T., Kikkawa, S., Tohyama, M., Sakanaka M., Tanaka, J., Maeda, N., Vitek, M. P. Mitsuda, N. (2003): Apolipoprotein E and Reelin ligands modulate tau phosphorylation through an apolipoprotein E receptor/ disabled-1/ GSK3 β cascade. *FASEB. J.* 17, 295-297.
57. Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P., Tsai, L. H. (1999): Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nat* 402(6762), 615-622.
58. Pesold, C., Impagnatiello, F., Pisu, M. G., Uzunov, D. P., Costa, E., Guidotti, A., Caruncho, H. J. (1998): Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing gamma-aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 95(6), 3221-6.

59. Prince, M., Jackson, J. World Alzheimer Report, Alzheimer's Disease International, 2009.
60. Qiu, C., Kivipelto M., and von Strauss, E., Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 2009. 11(2), p. 111-128.
61. Ramos-Moreno, T., Galazo, M. J., Porrero, C., Marinez-Cerdeno, V., Clasca, F. (2006): Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity: immunomapping of intracellular and secreted Reelin in the adult rat brain. *Eur J Neurosci* 23, 401-422.
62. Rebeck, G. W., Reiter J. S., Strickland D. K., Hyman B. T. (1993): Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 11(4), 575-580.
63. Reddy, S. S., Connor, T. E., Weeber, E. J., Rebeck, G. W. (2011): Similarities and differences in structure, expression, and function of VLDLR and ApoER2. *Mol Neurodegener*. Doi: 10.1186/1750-1326-6-30.
64. Selkoe, D. J. (2001): Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiol Rev* 81, 741-766.
65. Serrano, F., Klann, E. (2004): Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res. Rev.* 3, 431-443.
66. Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M. G., Whley, J., Swindlehurst, C., McCormack, R., Wlfert, R., Selkoe, D. j., Liebenburg, I., and Schenk, D. (1992): Isolation and quantitation of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids. *Nat* 359, 325-327.
67. Shakespeare, W. (1607/1608): *King Lear*. Philipp Reclam jun. (1986), Akt IV, Szene 7.

68. Stolzing, A., Grune, T. (2003): Impairment of Protein Homeostasis and Decline of Proteasome Activity in Microglial Cells From Adult Wistar Rats. *J. Neurosci. Res.* 71, 264-271.
69. Stoothoff, W. H., Johnson, G. V. (2005): Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim. Biophys. Acta* 1739, 280-297.
70. Strasser, V., Fasching, D., Hauser, C., Mayer, H., Bock, H. H., Hiesberger, T., Herz, J., Weeber, E. J., Sweatt, J. D., Pramatarova, A., Howell, B., Schneider, W. J., Nimpf, J. (2004): Receptor Clustering is Involved in Reelin Signaling. *Mol. Cell. Biol.* 10.1128/MCB.24.3., 1378-1386.
71. Strittmacher, W. J., Saunders A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., and Roses, A. D. (1993): Apolipoprotein E: highavidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci* 90, 1977-1981.
72. Tanaka. Y., Ando, S. (1990): Synaptic aging is revealed by changes in membrane potential and decreased activity of Na⁺, K⁺-ATPase. *Brain Res.* 506, 46-52.
73. Tissir, F., Goffinet, A. M. (2003): Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci* 4, 496-505.
74. Toescu, E. C., Verkhratsky, A., Landfield, P. W. (2004): Ca²⁺-regulation and gene expression in normal brain aging. *Trends Neurosci.* 27, 614-620.
75. Trojanowski, J. Q., Mattson, M. P. (2003): Overview of protein aggregation in single, double, and triple neurodegenerative brain amyloidosis. *Neuromolecular. Med.* 4, 1-6.
76. Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Herz, J. (1999): Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 97, 689-701.

77. Urosevic et Martins (2008): Infection and Alzheimer's disease: the APOE epsilon4 connection and lipid metabolism. *J. Alzheimers. Dis.* 13(4), 421-435.
78. Venkateshappa, C., Harish, G., Mahadevan, A., Srinivas Bharath, M. M., Shankar, S. K.(2012): Elevated oxidative stress and decreased antioxidant function in the human hippocampus and frontal cortex with increasing age: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 37(8), 1601-1614.
79. Verbeek, M. M., Vinters, H., De Waal, R. M. (2000): Cerebrovascular Amyloidosis in Alzheimer's disease and related Disorders.
80. Vereinte Nationen, Hauptabteilung wirtschaftliche und soziale Angelegenheiten, Abteilung Bevölkerungsfragen, Alterung der Weltbevölkerung 1950-2050, 2001.
81. Young-Pearse, T. L., Bai, J., Chang, R., Zheng, J. B., LoTurco, J. J., Selkoe, D. J. (2007): A Critical Funktion for β -Amyloid Precursor Protein in Neuronal Migration Revealed by In Utero RNA Interference. *J Neurosci* 27(52), 14459-14469.
82. Yu, X. M., Askalan, R., Keil, G. J., Salter, M. W. (1997): NMDA channel regulation by channel-associated protein tyrosine kinase Src. *Science* 275, 674-678.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

A β	Beta-Amyloid
AD	Alzheimer's disease, Alzheimer-Krankheit
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANOVA	Analysis of variance
ApoER2	Apolipoprotein E Rezeptor 2
APP	Amyloid precursor protein, Amyloidvorläuferprotein
Dab1	Disabled-1
DNA	Desoxyribonukleinsäure, Desoxyribonukleinsäure
EC	Entorhinalkortex
ECL	Enhanced chemiluminescence
FAD	Familiäre Alzheimer-Krankheit
FC	Frontalkortex
GABA	γ -Aminobuttersäure
GSK3 β	Glykogen-Synthase-Kinase 3 β
HC	Hippokampus
LTP	Langzeitpotentierung
M	Mol
NaOH	Natronlauge
NFT	Neurofibrilläre Tangle
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
RELN	Reelin
RNA	Ribonukleinsäure, Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard error of mean, Fehler des Stichprobenmittelwertes
SFK	Src family tyrosine Kinase
Taq	Thermus aquaticus Polymerase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
tg	Transgen
TgCRND8	Transgen CRND8
VLDLR	Very-low-density-Lipoprotein-Rezeptor
Wt	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Seniler Plaque (Silberfärbung) (Marcus et Jacobson, 2003).....	11
Abbildung 2: Neurofibrillärer Tangle (Silberfärbung) (Marcus et Jacobson, 2003).....	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Reelin-Signalkaskade.	15
Abbildung 4: Dab1-Expression im Hippokampus.....	36
Abbildung 5: Dab1-Expression im Entorhinalkortex.....	37
Abbildung 6: Dab1-Expression im Frontalkortex.	38
Abbildung 7: ApoER2-Expression im Hippokampus.	39
Abbildung 8: ApoER2-Expression im Entorhinalkortex.....	40
Abbildung 9: ApoER2-Expression im Frontalkortex.....	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anzahl der untersuchten Tiere pro Protein, Gehirnareal, Genotyp und Alter	24
Tabelle 2: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele	29
Tabelle 3: Verwendete Puffer/Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese	29
Tabelle 4: Verwendete Puffer/Lösungen für den Proteintransfer.....	31
Tabelle 5: Verwendete Antikörper	32

Geräteverzeichnis

Gerät	Hersteller
Blotting-Kammer	Trans-Blot Cell, BioRad, München
Elektrophoresekammer	BioRad, München
Heizblock	Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
Kamerasystem	ChemiDoc XRS, BioRad, München
Magnetrührer	IKA, Labortechnik, Staufen
Mikrodismembrator	Sartorius AG, Göttingen
Multicasting Chamber	Mini-PROTEAN3 Multi-Casting-Chamber, BioRad, München
Nitrozellulosemembran	Protran Nitrocellulose Membrane Filters, Whatman, Porengröße 0,2 µm, VWR International GmbH, Darmstadt
pH-Meter	Ph526, WTW, Weilheim
Quantifizierungssoftware	Software Image Lab Version 2.0, BioRad, München
Spannungsgerät	BioRad, München
Vortexgerät	Vortex Genie II, Scientific industries, Inc., New York, USA
Zentrifuge 1	Bifuge Pico, Heraeus, Hanau
Zentrifuge 2	Biofuge Fresco, Heraeus, Hanau

Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. med. Kathy Keyvani für die Möglichkeit, Unterstützung und Begutachtung meiner Dissertation bedanken. Mein ganz besonderer Dank gilt dabei ihrem bewundernswerten Engagement, unzähligen motivierenden sowie lehrreichen Gesprächen/Diskussionen und ihrer konstruktiven Kritik, durch die ich mich fachlich wie persönlich weiterentwickeln konnte.

Ausdrücklich danke ich Dr. rer. nat. Anja Meister für ihre exzellente Betreuung, ihren Beistand auch bei scheinbar unlösbaren Problemen im Labor und die unvergessliche gemeinsame Zeit.

Weiter möchte ich Manuel Paul Schweiger für eine unvergleichliche Zusammenarbeit, Motivation und Freundschaft danken.

Für eine angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre danke ich überdies Arne Herring, Ellen Uslar, Samira Hamzehian, Maxim Yarmolenko, Jan Scheich und Dimitrios Kanakis.

Nicht zuletzt sei meiner Familie und allen Freunden für ihre großartige und fortwährende Unterstützung in allen Lebensfragen während meiner Studien- bzw. Promotionszeit gedankt.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.